



Conceição Andrade Teixeira

Licenciada em Ciências de Engenharia Biomédica

Funcionalização de polímeros por plasma frio para aplicação em ortopedia

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadora: Dra. Susana Isabel dos Santos Silva Sérgio Venceslau, Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Dr. Paulo António Martins Ferreira Ribeiro, Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Dra. Célia Maria Reis Henriques, Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa

Arguente: Dra. Joana Maria Dória Vaz Pinto Morais Sarmiento, Professora Auxiliar Convidado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

Vogal: Dra. Susana Isabel dos Santos Silva Sérgio Venceslau, Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Setembro, 2018

Funcionalização de polímeros por plasma frio para aplicação em ortopedia

Copyright © 2018 Conceição Andrade Teixeira, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Aos meus pais que sempre acreditaram em mim

Agradecimentos

Agradeço de todo meu coração,

À minha orientadora, Professora Susana Sérgio, por todos os conhecimentos transmitidos, pela imensa dedicação que teve para comigo e por ter-se preocupado com o meu estar, nunca esquecerei o que fizeste por mim, muito obrigada.

Ao meu co-orientador, Professor Paulo Ribeiro, pela disponibilidade e ajuda prestada.

Ao Professor Jorge Silva pelos conhecimentos transmitidos, disponibilidade, acompanhamento e pela imensa paciência que teve comigo durante todo o processo.

À Professora Elvira Fortunado pelo acesso às infraestruturas do CENIMAT, nomeadamente ao difractor de raios-X.

Ao Afonso, Sara Pereira, Érica Karina, Professor Paulo Limão, Professor Filipe da Silva, pela humildade, simpatia e disponibilidade que me trataram durante todo o período no laboratório.

Ao meu amor, Dario Lopes, por ter estado ao meu lado em todos os momentos, ter sido minha âncora, contribuíste muito para que esse dia chegasse.

Ao meu pai, José António Teixeira, que me deu tudo o que tinha para poder conseguir ingressar no curso, o teu orgulho por mim deu-me força e coragem para enfrentar todas as dificuldades, mesmo distante nunca duvidaste da minha dedicação.

À minha mãe, Maria do Socorro Lobo de Andrade, mulher guerreira, determinada, és o meu maior exemplo, obrigada pelos conhecimentos transmitidos, foi contigo que nasceu a vontade de querer aprender sempre mais.

Às minhas irmãs, Jocelina e Melisa, e a todos os meus familiares, por terem sempre me apoiado e acreditado que eu venceria.

Aos amigos que pude fazer nesses 5 anos e que sempre tiveram uma palavra de consolo e incentivo para os momentos mais difíceis, por toda ajuda prestada e pelos momentos de descontração proporcionados.

A Deus que sempre me socorreu nos momentos mais conturbados.

Resumo

A ortopedia permitiu uma grande melhoria na vida das pessoas, possibilitando a substituição ou reparação de diferentes tecidos, no entanto, ainda existem algumas limitações como a perda de qualidade das próteses com o passar do tempo. Um biomaterial, para ser utilizado em ortopedia deve possuir elevada biocompatibilidade e resistência mecânica e também boa capacidade adesiva. O uso de biomateriais baseados em polímeros e cerâmicas permitiu resolver alguns dos problemas relacionados com o uso dos biomateriais metálicos, como a baixa resistência à corrosão. Ainda assim, os polímeros possuem fraca adesão celular, baixa resistência mecânica e as cerâmicas possuem uma baixa resistência à tração e muita baixa tenacidade à fratura. Com o intuito de encontrar novos biomateriais para responder às limitações existentes, surgiu o presente trabalho que tem como objetivo alterar as propriedades superficiais dos polímeros poliéter éter cetona (PEEK) e polietileno de alta densidade (PEAD), com vista à sua aplicação em próteses ortopédicas. Estes polímeros apresentam boa biocompatibilidade e boa resistência mecânica, porém possuem baixa capacidade adesiva. De forma, a ultrapassar esta desvantagem os polímeros foram modificados através da pulverização catódica, por deposição de filmes de TiO_2 , que apresentam as características adequadas para a aplicação desejada.

Após o revestimento com TiO_2 os materiais obtidos foram caracterizados por difração de raios-X, microscopia eletrônica de varrimento e medidas do ângulo de contato, de modo a avaliar as características estruturais e morfológicas. Para avaliar a biocompatibilidade e as propriedades adesivas dos biomateriais desenvolvidos foram efetuados testes de citotoxicidade com células Vero e de adesão com células de osteoblastos, o que permitiu concluir que o revestimento com TiO_2 aumenta a biocompatibilidade e adesão celular dos polímeros, podendo também aumentar a resistência mecânica.

Palavras chaves: Ortopedia, polímeros, pulverização catódica, PEEK, PEAD, TiO_2 .

Abstract

Orthopedics has allowed a great improvement in people's lives, enabling the replacement or repair of different tissues, however there are still some limitations such as the loss of quality of the prostheses over time. A biomaterial, to be used in orthopedics must possess high biocompatibility, excellent mechanical resistance and good adhesive capacity.

The use of biomaterials based on polymers and ceramics allowed to solve some of the problems related to the use of metallic biomaterials, such as low resistance to corrosion. Nevertheless, the polymers have poor adhesion to the cells, low mechanical resistance and the ceramics exhibit a low tensile strength and very low fracture toughness. In order to find new biomaterials that respond to the existing limitations, has appeared the present work that aims to modify the surface properties of PEEK and HDPE polymers, regarding their application in orthopedic prostheses. These polymers present good biocompatibility and mechanical resistance, however they possess low adhesive capacity.

In order to overcome this disadvantage, the polymers were modified by sputtering, through the deposition of TiO_2 films, which have the suitable characteristics for the desired application.

After TiO_2 coating, the obtained materials were characterized by X-ray diffraction, scanning electron microscopy and contact angle measurements in order to evaluate their structural and morphological characteristics. To evaluate the biocompatibility and adhesive properties of the developed biomaterials, cytotoxicity and adhesion tests with Vero and osteoblast cells, respectively, were carried out, which allowed to conclude that the TiO_2 coating increases the biocompatibility and adhesion of the polymers and may also increase the mechanical resistance.

Keywords: Orthopedics, polymers, cathodic sputtering, PEEK, HDPE, TiO_2 .

Índice

Agradecimentos	V
Resumo	VII
Abstract	IX
Índice	XI
Índice de figuras e Gráficos	XIII
Índice de tabelas	XV
Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos	XVII
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	7
2.1 Plasma	7
2.2 Aplicações do plasma frio na modificação de superfícies sólidas	9
2.3 Polímeros	9
2.4 Interação do plasma com o polímero	11
Fotões	11
Espécies neutras	12
Partículas carregadas	12
2.5 Ativação e funcionalização de superfícies de polímeros	13
2.6 Titânio/Dióxido de Titânio	13
3 Materiais e Métodos	15
3.1 Materiais	15
3.2 Métodos	16
Descarga de Barreira Dielétrica (DBD)	16
Pulverização catódica – <i>Sputtering</i>	19
Pulverização catódica assistida por cátodo magnetron	20
3.3 Técnicas de caracterização	22
Molhabilidade: Medidas de Ângulo de Contato	22
Difração de Raios-X	23
Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)	24
Citotoxicidade	25
Teste de adesão das células e marcação com DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol)	25
3.4 Procedimento experimental	25
Funcionalização do PEEK e do PEAD por Descarga de Barreira Dielétrica	25
Deposição de filmes de dióxido de titânio no PEEK e PEAD através da técnica pulverização catódica	28
Determinação da citotoxicidade do PEEK e do PEAD pelo método do extrato	31
4 Análise de resultados	35
4.1 Medidas do ângulo de contato	35
4.1.1 Descarga de barreira dielétrica	35

4.1.2 Pulverização catódica.....	37
4.2 Difração de raios-X	39
4.3 Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)	43
4.4 Citotoxicidade	51
4.5 Teste de adesão das células e marcação com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)	56
5 Conclusões e trabalho futuro	63
5.1 Conclusões.....	63
5.2 Trabalho futuro	65
6 Referências bibliográficas:	67
7 Anexos.....	71

Índice de figuras e Gráficos

Figura 1.1- a) quadril sem prótese b) quadril com prótese (adaptado de [3]).	2
Figura 1.2- Constituição de uma prótese do quadril (retirado de [7]).	4
Figura 3.1- Configurações típicas de descarga de barreira dielétrica (Adaptado de [46]).	17
Figura 3.2- Etapas envolvidas no processo de descarga de barreira dielétrica	17
Figura 3.3- Regimes de operação do plasma por DBD: (a) - Regime difuso; (b) - Regime filamentar. (retirado de [47])	18
Figura 3.4- Reator de plasma DBD para a funcionalização de polímeros (adaptado de [16]).	19
Figura 3.5- Processo de pulverização catódica (retirado de [12])	20
Figura 3.6- Processo de pulverização catódica assistida por cátodo magnetron (retirado de [12]).	21
Figura 3.7- Sistema de pulverização catódica para a deposição de filmes de óxido de titânio (retirado de [57]).	22
Figura 3.8- Representação do ângulo de contato e das tensões superficiais de um líquido sobre uma superfície sólida (adaptado de [51])	23
Figura 3.9- Imagem em cima- PEAD (branco), PEEK (castanho) em grânulos, imagem em baixo PEAD e PEEK em filme.	26
Figura 3.10- Descarga de TiO_2 durante o depósito.	29
Figura 3.11- Descarga de argon durante a limpeza do alvo.	29
Figura 4.1- Imagens de SEM obtidas para os filmes de TiO_2 em PEEK.	45
Figura 4.2- Imagens de SEM obtidas para os filmes de TiO_2 em PEAD. ... Erro! Marcador não definido.	
Figura 4.3- Imagem da secção transversal obtida pelo SEM da amostra do PEEK com 50% de oxigénio e 1000W de potência.	47
Figura 4.4- Esquema da geometria presente no cálculo da espessura dos filmes finos através das imagens SEM da secção transversal (retirado de [50]).	47
Figura 4.5- Imagem da secção transversal do PEEK a 1500W e 25% de oxigénio.	48
Figura 4.6- Placa com as culturas efetuadas para a leitura da absorvância.	57
Figura 4.7- Fluorescência do PEEK no canal verde.	60
Figura 4.8- Fluorescência do PEEK no canal vermelho.	60
Figura 4.9- Imagens dos núcleos das células obtidas para os filmes de TiO_2 em PEEK.	60
Figura 4.10- Imagens dos núcleos das células obtidas para os filmes de TiO_2 em PEAD.	61
Gráfico 4.1- Variação do Ângulo de contato em função do tempo dos filmes de TiO_2 em PEEK e comparação com o ângulo sem funcionalização.	36
Gráfico 4.2- Variação do ângulo de contato em função do tempo dos filmes de TiO_2 em PEAD e comparação com o ângulo sem funcionalização.	37
Gráfico 4.3- Variação do ângulo de contato dos filmes de TiO_2 em PEEK em função da potência e percentagem de oxigénio.	38
Gráfico 4.4- Variação do ângulo de contato dos filmes de TiO_2 em PEAD em função da potência e percentagem de oxigénio.	39
Gráfico 4.5- Difractograma de raios-X obtido para o PEEK sem tratamento.	40
Gráfico 4.6- Difractograma de raios-X obtido para o PEAD sem tratamento.	40

Gráfico 4.7- Difractogramas de raios-X do filme de TiO_2 no substrato de vidro depositado a 500W e com diferentes percentagens de oxigénio.....	41
Gráfico 4.8- Difractogramas de raios-X do filme de TiO_2 no substrato de vidro depositado a 1000W e com diferentes percentagens de oxigénio.....	41
Gráfico 4.9- Difractogramas de raios-X do filme de TiO_2 no substrato de vidro depositado a 1500W e com diferentes percentagens de oxigénio.....	43
Gráfico 4.10- Espessura do filme de TiO_2 em PEEK depositado com diferentes percentagens de oxigénio e potência.....	49
Gráfico 4.11- Espessura do filme de TiO_2 em PEAD depositado com diferentes percentagens de oxigénio e potência.....	50
Gráfico 4.12- Espectro EDS da amostra do PEEK produzido a 1000W e com 75% de oxigénio.	51
Gráfico 4.13- Viabilidade celular do PEEK sem tratamento e do PEEK com filme de TiO_2 depositado com diferentes percentagens de O_2 e de potência aplicada.....	55
Gráfico 4.14- Viabilidade celular do PEAD sem tratamento e do PEAD com filme de TiO_2 depositado com diferentes percentagens de O_2 e de potência aplicada.....	56
Gráfico 4.15- Taxa de adesão e de proliferação de células nas amostras do PEEK e do PEAD com TiO_2	58

Índice de tabelas

Tabela 2.1- classificação do plasma segundo a sua temperatura (adaptado de [15])	8
Tabela 2.2- Energia dos fótons no espectro electromagnético (retirado de [30])	12
Tabela 3.1- Características dos alvos de titânio utilizados	22
Tabela 3.2- Parâmetros utilizados na funcionalização do PEEK.....	27
Tabela 3.3- Parâmetros utilizados na funcionalização do PEAD	27
Tabela 3.4- Réplicas efetuadas na funcionalização do PEEK e PEAD	27
Tabela 3.5- Parâmetros de deposição de filmes TiO ₂ utilizados no PEEK.....	30
Tabela 3.6- Parâmetros de deposição de filmes TiO ₂ utilizados no PEAD	31
Tabela 3.7- Calendário do teste de citotoxicidade.	33
Tabela 4.1- Média dos ângulos de contato do PEEK e do PEAD.	35
Tabela 4.2- Espessura do filme de TiO ₂ para as amostras do PEEK.	48
Tabela 4.3- Espessura do filme de TiO ₂ para as amostras do PEAD.....	48
Tabela 4.4- Resultados obtidos da viabilidade celular para o PEEK normal e para o PEEK com filme de TiO ₂ depositado com diferentes percentagens de O ₂ e de potência aplicada.....	52
Tabela 4.5- Média e desvio padrão obtidos do controlo do meio para o PEEK.	52
Tabela 4.6- Resultados obtidos para o controlo positivo e o controlo negativo do PEEK.	52
Tabela 4.7- Resultados obtidos da viabilidade celular para o PEAD normal e para o PEAD com filme de TiO ₂ depositado com diferentes percentagens de O ₂ e de potência aplicada.....	53
Tabela 4.8- Média e desvio padrão obtidos do controlo do meio para o PEAD.....	53
Tabela 4.9- Resultados obtidos para o controlo positivo e o controlo negativo do PEAD.	53
Tabela 4.10- Classificação da citotoxicidade de um material através da percentagem da viabilidade celular relativa.	53
Tabela 4.11- Valores da adesão e do teste t-student obtidos para os filmes do PEEK e do PEAD com e sem revestimento de filmes de TiO ₂	59

Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos

DBD – Descarga de Barreira Dielétrica
PEEK – Poliéter éter cetona
PEAD – Polietileno de alta densidade
PAEK – Poliariletercetonas
PMMA – Polimetil metacrilato
 T_g – Temperatura do gás
 T_e – Temperatura do eletrão
 T_i – Temperatura do ião
 n_e – Densidade de eletrões
K – Unidade da temperatura em kelvin
LTE – *Local Thermodynamic Equilibrium*
 γ – Tensão Superficial
 γ_{sv} – Tensão superficial entre o sólido e o vapor
 γ_{sl} – Tensão superficial entre o sólido e o líquido
 γ_{lv} – Tensão superficial entre o líquido e o vapor
gap – Distância entre os elétrodos num Reator de Plasma de DBD
 λ – Comprimento de onda
 θ – Ângulo de difração
 θ_c – Ângulo de contato
SEM – *Scanning Electron Microscopy*
DC – Corrente contínua
PBT – Polibutileno Tereftalato
BGs – Vidros bioativos
CaPs – Fosfatos de Cálcio
TCPs – Fosfatos Tricálcico
HA – Hidroxiapatita
UHMWPE – *Ultra-high-molecular-weight polyethylene*
PGA – Ácido Poliglicólico
PLA – Ácido polilático
PDS – Polidioxanona
PCL – Poli (3-caprolactona)
PHB – Poli-hidroxibutirato
PHEMA – Poli (2-hidroxi-etila-metacrilato)
PP – Polipropileno
SR – Silicone rubber
PEG – Polietilenoglicol
PU – Poliuretano
PTFE – Politetrafluoretileno
PA – Poliacetal
PET – Politereftalato de etileno
PS – Polissulfona
FC – Fibras de carbono
GF – Glass fibers
EDS – Espectroscopia de raios X por dispersão em energia
DMSO – Dimetilsulfóxido
DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol

1 Introdução

Neste capítulo é apresentado um pouco da história da ortopedia e as melhorias que tem vindo a proporcionar na qualidade de vida das pessoas. Serão também abordadas as suas limitações e as possíveis melhorias que este trabalho possa vir a oferecer.

Os desenvolvimentos tecnológicos e na área da saúde têm permitido uma melhoria na qualidade de vida, resultando num aumento da esperança média de vida, bem como na melhoria dos problemas degenerativos e inflamatórios dos ossos e articulações, que afetam milhões de pessoas em todo o mundo. Sabe-se que esses problemas correspondem a metade de todas as doenças crónicas em pessoas com mais de 50 anos de idade nos países desenvolvidos [1]. Em Portugal, tal como na maioria dos países desenvolvidos, a percentagem da população idosa (a partir dos 65 anos) tem aumentado. De acordo com projeções nacionais, em 2030, os idosos devem representar aproximadamente 26% da população, aumentando para 29% em 2060. O número de pessoas com mais de 80 anos duplicará entre 2015 e 2060 e deverá aumentar de 614000 a 1421000 pessoas [2]. Esses dados são preocupantes, pois além dos problemas mencionados anteriormente, numerosas fraturas ósseas, dor lombar, osteoporose, escoliose e outros problemas musculoesqueléticos estão presentes nesta faixa etária e precisam ser resolvidos recorrendo a dispositivos permanentes, temporários ou biodegradáveis, isto é, aos biomateriais ortopédicos [1].

A ortopedia tem com principal função implantar no corpo humano esses biomateriais com capacidade de realizar certas funções biológicas, substituindo ou reparando diferentes tecidos, como osso, cartilagem ou ligamentos e tendões, e até mesmo orientando a reparação óssea quando necessário, como se pode ver no exemplo da figura 1.1. Atualmente, existem importantes requisitos em ortopedia que necessitam de ser cumpridos, tanto na substituição de ossos e articulações como na reparação e regeneração de defeitos ósseos. Neste contexto, foram feitos enormes avanços no campo dos biomateriais nos últimos 60 anos, onde três gerações parecem estar claramente marcadas: a primeira geração, corresponde aos materiais bioinertes, a segunda geração, abrange os materiais bioativos e biodegradáveis e finalmente, a terceira geração, engloba os materiais destinados a estimular respostas celulares específicas ao nível molecular. Estas três gerações devem ser interpretadas como conceituais, uma vez que cada geração representa uma evolução nos requisitos e propriedades dos materiais envolvidos, o que significa que, atualmente, a pesquisa e o desenvolvimento ainda são dedicados a biomateriais que, de acordo com suas propriedades, poderiam ser considerados da primeira ou segunda geração. Os materiais que cada nova geração traz, não implica necessariamente o anulamento dos que estão em uso [1].

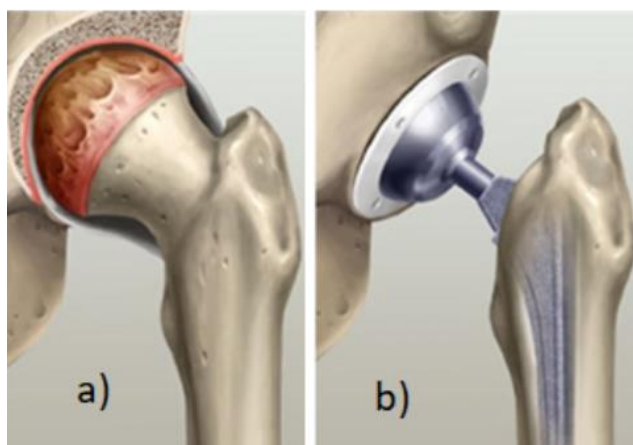


Figura 1.1- a) quadril sem prótese b) quadril com prótese (adaptado de [3]).

Como o corpo humano consiste em um ambiente altamente corrosivo, requisitos muito rigorosos são impostos às propriedades dos materiais candidatos. Consequentemente, a primeira geração de biomateriais consistia em materiais facilmente disponíveis, de uso industrial, que eram obrigados a ser tão inertes quanto possível, a fim de reduzir a corrosão e a liberação de íons e partículas após a implantação. As propriedades mecânicas também desempenhavam um papel importante na seleção dos materiais candidatos para a fabricação de implantes. Outro requisito importante, era o conceito de biocompatibilidade, que associado a um conjunto de testes padronizados *in vitro* e *in vivo*, permitia avaliar o comportamento biológico de materiais sintéticos. Nos materiais sintéticos, o único requisito consistia na combinação adequada de propriedades físicas correspondentes às do tecido substituído, com uma resposta tóxica mínima do hospedeiro. Esses eram os "biomateriais de primeira geração", de acordo com a classificação de Hench, porque eram "inertes" [1].

Entre 1980 e 2000 surge a segunda geração de biomateriais e foi definida pelo desenvolvimento de materiais bioativos capazes de interagir com o ambiente biológico para melhorar a resposta biológica e a ligação tecido/superfície, assim como pelo desenvolvimento da capacidade dos materiais bioabsorvíveis sofrerem uma degradação progressiva, enquanto o novo tecido se regenera e cura. A bioatividade refere-se a qualquer interação ou efeito que os materiais exercem sobre as células com o objetivo de conduzi-las ou ativá-las para respostas e comportamentos específicos, sendo que a mineralização e ligação entre o tecido ósseo e o implante é um dos processos mais conhecidos atualmente para aumentar a bioatividade em aplicações de reparo e fixação óssea [1].

Os biomateriais da terceira geração correspondem a novos materiais capazes de estimular respostas celulares específicas a nível molecular. Para esses biomateriais, os conceitos de bioatividade e biodegradabilidade são combinados e os materiais bioabsorvíveis tornam-se bioativos ou vice-versa. As propriedades desses materiais devem-se fundir com sua capacidade

de sinalizar e estimular atividade e comportamento celular específicos. No âmbito desta geração estão a ser desenvolvidas estruturas porosas tridimensionais temporárias que estimulam a invasão, fixação e proliferação de células, bem como superfícies funcionalizadas com sequências peptídicas que mimetizam os componentes da matriz extracelular, de modo a desencadear respostas celulares específicas. A engenharia de tecidos é uma área emergente oferecendo potenciais soluções alternativas ao transplante de tecidos e enxertos. O uso de aloenxertos, autoenxertos e xenoenxertos apresenta várias limitações, como escassez do sítio doador, rejeição, transferência de doenças, custos de colheita e morbidade pós-operatória. Além disso, a engenharia de tecidos envolve a manipulação de células, o que não é uma questão simples e direta, e como tal representa uma grande desvantagem para o uso generalizado desta técnica em ambiente hospitalar. Apesar disso, a engenharia de tecidos é uma tecnologia muito promissora que abre inúmeras possibilidades de estudo e pesquisa no campo da medicina regenerativa [1, 4].

Durante o século XX, os primeiros materiais metálicos a serem utilizados com sucesso em aplicações ortopédicas foram as ligas de aço inoxidável e de cobalto-crômio. O titânio e as ligas de titânio foram introduzidos na década de 1940. As ligas com memória de forma, NiTi, surgiram na década de 1960 e pareciam abrir toda uma nova gama de aplicações, devido ao seu comportamento mecânico especial, mas o efeito alergénico dificultou o seu uso. Os materiais de aço inoxidável são resistentes a uma ampla gama de agentes corrosivos devido ao seu alto teor de Cr (mais de 12%), o que leva à formação de um óxido na superfície, de Cr_2O_3 , fortemente aderente, auto-reparador e resistente à corrosão. O aço inoxidável é largamente utilizado em dispositivos temporários traumatológicos, como placas de fratura, parafusos e pregos de quadril, entre outros, essencialmente devido ao seu custo relativamente baixo, disponibilidade e fácil processamento. O seu uso em prótese de articulação ortopédica é restrito porque outras ligas metálicas, como as ligas à base de Ti e de Co-Cr, exibem propriedades mecânicas e de corrosão superiores [1, 5]. Relativamente aos biomateriais cerâmicos da primeira geração, os mais utilizados são alumina, zircónia e várias cerâmicas porosas. A alumina tem sido muito usada (à cerca de 20 anos) devido aos seus baixos coeficientes de atrito e desgaste, porém o seu módulo de elasticidade muito elevado (380 GPa) em comparação com o osso esponjoso, provocam sérios problemas de stress mecânico, em pacientes idosos com osteoporose ou artrite reumatoide, levando ao afrouxamento do copo acetabular da alumina [1, 4]. Alguns exemplos de biomateriais de polímeros da primeira geração são a borracha de silicone, polietileno (PE), resinas acrílicas, poliuretanos, polipropileno (PP) e polimetilmetacrilato (PMMA). Do ponto de vista dos biomateriais, os cimentos ósseos de PMMA apresentam vários inconvenientes associados ao seu uso, nomeadamente o monómero residual pode entrar no suprimento sanguíneo produzindo uma embolia, a diferença de rigidez entre a prótese metálica e o osso pode induzir stress ou sobrecarga que podem produzir fraturas no cimento e a libertação de

partículas de cimento que, interagindo com os tecidos circundantes, podem induzir uma reação inflamatória. O PE, e mais especificamente o polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE), é particularmente atraente para aplicações como o revestimento de copos acetabulares nas artroplastias totais do quadril, no implante tibial, no componente patelar nas artroplastias totais do joelho e como espaçador na substituição do disco artificial intervertebral. As suas propriedades únicas de alta resistência à abrasão e ao impacto, baixa fricção, elevada tenacidade e baixa densidade, facilidade de fabricação, biocompatibilidade e bioestabilidade, tornam este material um candidato ideal. No entanto, o desgaste ocorrerá e os detritos de desgaste levarão a efeitos indesejáveis. O desenvolvimento de interfaces bioativas provocando uma resposta biológica específica é de extrema importância nos biomateriais de segunda geração [1, 6]. Na figura 2 encontra-se representado um exemplo de uma prótese constituída pelos diferentes tipos de biomateriais.



Figura 1.2- Constituição de uma prótese do quadril (retirado de [7]).

Na segunda geração de biomateriais são utilizados os mesmos materiais que são usados na primeira geração, isto é, metais, cerâmicas e polímeros, porém com características distintas, ou seja, bioativas e biodegradáveis. Nesta geração os materiais cerâmicos classificados como vidro-cerâmica (BGs) e fosfatos de cálcio (CaPs), são utilizados como substitutos ósseos desde de 1970 e são usados principalmente como preenchedores de defeitos ósseos. As semelhanças entre a fase mineral óssea e as suas características estruturais e superficiais são responsáveis pelas boas propriedades bioativas que exibem, permitindo a ligação ao osso sem a mediação de uma interface fibrosa do tecido conjuntivo. A hidroxiapatita (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), o beta fosfato tricálcico (β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), os seus derivados e as suas combinações são as cerâmicas mais comumente utilizadas. A hidroxiapatita mostra boas propriedades bioativas, no entanto, a sua estabilidade química reduz a sua taxa de solubilidades em comparação com outros CaPs. Após a implantação a hidroxiapatita pode permanecer integrada no tecido ósseo

regenerado, enquanto que os TCPs são completamente reabsorvidos. A presença do silício em cerâmicas e vidros biológicos tem efeito significativo no processo de osteogênese, pois o silício desempenha um papel essencial na formação óssea. As fracas propriedades mecânicas, baixa resistência à tração e à fratura, dos BGs faz com que não sejam adequados para aplicações de suporte de carga. Por outro lado, os BGs foram utilizados com sucesso em aplicações de materiais de baixa carga para reparo ósseo em cirurgias odontológicas e ortopédicas. Em relação aos materiais metálicos utilizados em ortopedia nenhum por si só é bioativo, pelo que não são adequados para biomateriais da segunda geração. No entanto, duas abordagens podem ser consideradas para torná-los bioativos, nomeadamente revestir a superfície do implante com uma cerâmica bioativa (HA e BGs) ou modificar quimicamente a superfície do material. Polímeros biodegradáveis de origem sintética e natural, como ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (PLA), polidioxanona (PDS), poli (3-caprolactona) (PCL), poli-hidroxibutirato (PHB), poliortoéster, quitosano, poli (2-hidroxi-etila-metacrilato) (PHEMA), ácido hialurônico e outros hidrogéis foram extensivamente estudados na segunda geração de biomateriais. A utilização do ponto de vista mecânico de polímeros em vez de metais no uso de implantes bioabsorvíveis tem várias vantagens: reduzem o efeito de blindagem de stress, eliminam as cirurgias subsequentes que podem ser necessárias para remover o implante metálico e permitem a obtenção de imagens de diagnóstico no pós-operatório, evitando artefactos. Muitos compostos macromoleculares são bioabsorvíveis, mas apenas alguns têm as propriedades necessárias para dispositivos de fixação óssea interna. PLA, PGA e PDS têm sido os mais amplamente utilizados para tais fins. A resistência mecânica dos implantes poliméricos bioabsorvíveis foi melhorada pelo uso do processo de auto-reforço. Esta abordagem consiste em reforçar a matriz polimérica com fibras orientadas do mesmo material. Uma das limitações dos polímeros é a sua biodegradabilidade, que é originada principalmente pela hidrólise do esqueleto da cadeia polimérica e, em menor grau, pela atividade enzimática. Os tempos de degradação dependem de múltiplos fatores, como cristalinidade do polímero, peso molecular, histórico térmico, porosidade, concentração de monómero, geometria e localização do implante. Quitosano, PHEMA, PEG e ácido hialurônico estão entre os hidrogéis mais relevantes estudados nesta segunda geração de biomateriais. A estrutura e as propriedades dos hidrogéis são atribuídas às ligações de macromoléculas hidrofílicas por meio de hidrogénio covalente e ligações iónicas que formam uma rede tridimensional capaz de reter grandes quantidades de água na sua estrutura. Esses tipos de polímeros têm sido usados principalmente em aplicações de cartilagem, ligamentos, tendões e reparo de discos intervertebrais. Além desses biomateriais, a segunda geração também utiliza os compósitos que consistem na conjugação dos diferentes biomateriais, como por exemplo o HAPEX que consiste numa matriz de polietileno reforçado com partículas de hidroxiapatita. A hidroxiapatita atua como o agente bioativo que promove a fixação dos osteoblastos, enquanto o polietileno, a matriz, é um polímero inerte estável e não biodegradável. A utilização de

compósitos tem como objetivo obter um material com propriedades mecânicas semelhantes às do osso que possam formar ligações bioativas com o tecido ósseo e onde o processo de degradação coincida com o período de cicatrização da fratura ou lesão. A adesão entre os componentes das duas fases é uma das principais preocupações que precisa ser resolvida. A estratégia mais eficaz para melhorar a adesão na interface entre a matriz orgânica e o reforço inorgânico é modificar quimicamente ambas as fases, a fim de criar uma ligação química biocompatível entre elas [1, 4 – 6, 8, 9].

Apesar da grande evolução que a ortopedia já sofreu, os biomateriais empregues ainda possuem limitações. Existem diversas combinações desses biomateriais que têm como objetivo obter um biomaterial que responda às características exigidas, no entanto, ainda apresentam desvantagens, uns a nível do preço e outros mesmo em relação à qualidade. Desta forma, muitas investigações estão em curso com objetivo de encontrar biomateriais que apresentem uma excelente biocompatibilidade, elevada resistência mecânica e à corrosão, não seja citotóxico, não altere de tamanho ao longo do tempo e grande capacidade de adesão às células. De forma a encontrar este biomaterial surge esta dissertação, que tem como objetivo funcionalizar os polímeros poliéter éter cetona (PEEK) e o polietileno de alta densidade (PEAD) através de tecnologias de plasma e revesti-los com filmes de dióxido de titânio, de modo a estudar a sua aplicabilidade em ortopedia [10–12].

O PEEK possui uma elevada biocompatibilidade, não é citotóxico, tem uma boa resistência química, resistente a altas temperaturas e apresenta propriedades mecânicas semelhantes às dos ossos humanos. No entanto, este polímero tal como a maioria dos polímeros possui baixa energia livre superficial o que resulta numa fraca adesão celular. O PEAD possui uma boa resistência a alterações do meio a baixas temperaturas e uma excelente resistência química e mecânica, porém, é suscetível a quebra por stress e é pouco maleável. O dióxido de titânio possui uma excelente compatibilidade biológica, elevada resistência mecânica e alta resistência à corrosão, possui efeito bactericida e protege contra infeções pós-operatórias.

A funcionalização foi levada a cabo por plasma frio, produzido a partir de descarga de barreira dielétrica em ambiente controlado. Após a funcionalização dos polímeros, foram aplicadas técnicas de caracterização, de modo a avaliar as propriedades estruturais, morfológicas e de molhabilidade. A deposição dos filmes de dióxido de titânio sobre os polímeros foi efetuada pela técnica de pulverização catódica. Na fase final deste trabalho e para avaliar a biocompatibilidade e as propriedades adesivas dos materiais desenvolvidos, características importantes para que um biomaterial se adeque a aplicações médicas, nomeadamente em próteses ortopédicas, foram realizados ensaios celulares com osteoblastos, que são células envolvidas na formação do tecido ósseo [8– 4].

2 Revisão Bibliográfica

Este capítulo tem como objetivo explicar os conceitos teóricos necessários para a realização deste trabalho, bem como dos fundamentos da tecnologia de plasma frio. É ainda apresentada uma breve descrição das vantagens da utilização de polímeros e do dióxido de titânio na área médica e quais as suas aplicações.

2.1 Plasma

A matéria pode encontrar-se em quatro estados, isto é, sólido, líquido, gasoso e plasma. A condição de um gás parcialmente ionizado é definida como plasma, sendo também considerado como matéria num estado excitado. Na sua forma natural é encontrado em corpos celestes como estrelas ou auroras boreais e artificialmente produzido através de descargas elétricas em atmosfera gasosa. A fonte de eletrões é gerada por uma descarga luminescente de elevada energia, confinada entre eletrodos em alta tensão. A transferência de energia é resultante das sucessivas colisões entre os eletrões formados e as moléculas oriundas do gás, produzindo fragmentos metaestáveis, iões, moléculas, espécies neutras de elevada energia, átomos e fotões [15, 16].

Vários estudos sobre aplicações de reações químicas em plasma têm sido efetuados ao longo do tempo. O uso do plasma em aplicações biológicas iniciou-se no final da década de 1850, quando Siemens usou uma descarga de barreira dielétrica para gerar ozono. Depois desse período não foi realizada nenhuma pesquisa sistemática, de forma a compreender a interação entre plasma e as células biológicas. Entretanto, desde a década de 1960 até a década de 1980 foram efetuados alguns estudos com o objetivo de aplicar o plasma na esterilização biológica. Somente em meados de 1990 é que o tema plasma tornou-se num tópico de pesquisa importante, surgindo assim as investigações dos efeitos do plasma em células bacterianas [17].

O plasma tem sido alvo de várias investigações, principalmente no campo de engenharia química, permitindo um aumento significativo na eficiência dos processos químicos e muitas vezes na estimulação de reações químicas, impossíveis na química convencional. Aplicações promissoras no contexto médico e biológico, como eletrocirurgia, engenharia de tecidos, modificação de superfície de materiais biocompatíveis e esterilização de materiais e instrumentos sensíveis ao calor, têm gerado um enorme interesse na comunidade científica [15, 18].

A classificação do plasma, considerando a temperatura, divide-se em plasma de alta temperatura e plasma de baixa temperatura. O plasma de baixa temperatura ainda é subdividido em plasma

térmico e plasma não térmico ou plasma frio, como apresentado na tabela 2.1 [15].

O plasma térmico é definido como um equilíbrio termodinâmico local, sendo a temperatura do gás (T_g) aproximadamente igual à temperatura dos elétrons (T_e) e dos íons (T_i). Quando a temperatura dos elétrons é muito superior à temperatura dos íons, o plasma encontra-se em desequilíbrio termodinâmico, sendo designado plasma não térmico ou plasma frio.

O plasma térmico pode proporcionar um ambiente de temperatura muito elevada ($10^3 \sim 10^4$ K), que não é alcançável nos processos convencionais da engenharia química, permitindo realizar processos mais limpos como, por exemplo, a conversão do carvão para acetileno, tratamento de resíduos e o fabrico de nanomateriais. O plasma frio é caracterizado por um sistema de múltiplos componentes altamente reativos, consistindo numa concentração de partículas carregadas, átomos, moléculas excitadas, radicais e fótons UV. Como a temperatura dos elétrons geralmente excede significativamente a temperatura das partículas pesadas ($T_e \gg T_i$), os processos químicos em tais plasmas são determinados diretamente pela temperatura dos elétrons e portanto, não são tão sensíveis aos processos térmicos e à temperatura do gás. Este tipo de plasma pode ser gerado em sistemas de descarga por pulsos, como descarga de corona ou descarga de barreira dielétrica (DBD), que foi a utilizada neste trabalho [15, 16].

Tabela 2.1- classificação do plasma segundo a sua temperatura (adaptado de [15])

Plasma de baixa temperatura		Plasma de alta temperatura
Plasma Térmico:	Plasma não térmico ou plasma frio:	$T_e \approx T_i > 10^7\text{ K}$ $n_e \geq 10^{20}\text{ m}^{-3}$ Ex: Plasma de fusão
$T_e \approx T_i \approx T_g \sim 10^4\text{ K}$ $n_e \sim 10^{20}\text{ m}^{-3}$ Ex: Arco de plasma	$T_i \ll T_e \sim 10^4\text{ K}$ $T_g \sim 10^2\text{ K}$ Ex: Plasma de descarga luminescente	

Onde T_e é a temperatura do elétron, T_i temperatura do ião, T_g a temperatura do gás e n_e a densidade de elétrons

2.2 Aplicações do plasma frio na modificação de superfícies sólidas

O plasma é extremamente usado na modificação das propriedades superficiais dos materiais, com grande importância em vários campos industriais para modificações óticas, físicas e químicas. Por exemplo, cerca de um terço dos processos necessários para fazer um chip semicondutor envolvem um processo baseado em plasma. Num plasma reativo típico, a química da fase gasosa é extremamente complexa porque os eletrões altamente energéticos podem ativar um grande número de reações, em que as espécies incluem átomos e moléculas neutras, iões positivos, negativos, radicais, eletrões e fotões. Essas espécies interagem com a superfície de materiais que ativam uma série de processos que podem ser resumidos em reação de inserção de átomos ou grupos químicos, geração de radicais livres na superfície (ativação), deposição de camadas finas aderentes à superfície (deposição de filme), remoção química ou física da superfície do material (*etching*) [14, 19].

Esta técnica é aplicada para melhorar a molhabilidade (propriedades hidrofílicas), a capacidade de impressão e a adesão em superfícies de polímeros, sem causar danos térmicos devido às baixas energias envolvidas. A possibilidade de tratar (e revestir) uma superfície a baixa temperatura e a uma pressão próxima da atmosférica é uma vantagem importante para aplicações industriais. O tratamento de superfície destina-se a proporcionar uma mudança estável e de longo prazo da tensão superficial dos materiais tratados. Outros campos de aplicação bem conhecidos são a limpeza de superfícies metálicas (descontaminação) e sua esterilização, bem como a degradação de compostos orgânicos [16, 18, 20– 23].

A modificação de superfícies de materiais para aplicação médica, através do plasma, é utilizada para a otimização da biofuncionalidade ou biocompatibilidade de implantes ou para conduzir as superfícies dos polímeros a um estado ótimo para a cultura celular e a engenharia de tecidos. Tais modificações de biomateriais vão desde mudança da morfologia superficial e da textura até à geração de propriedades superficiais especiais, nomeadamente físicas ou químicas. Para aplicações que requerem contato direto do plasma com tecidos vivos, são necessários dispositivos de plasma que funcionam à pressão atmosférica, onde as técnicas de tratamento são alvos de pesquisa há algum tempo, estando ainda numa fase muito inicial a sua introdução na medicina, embora os estudos já realizados mostrem grande potencialidade desta tecnologia neste campo [24].

2.3 Polímeros

As estruturas formadas por milhares de unidades repetitivas (monómeros) são designadas de polímeros ou macromoléculas e são caracterizadas pelo seu elevado peso molecular. A estrutura

química e o padrão de distribuição da massa molar são as duas características fundamentais que determinam todas as propriedades de um polímero. Estas características, diretamente determinam as forças coesivas, a densidade de empacotamento (e potencial cristalinidade) e a mudança de fase (com transição de fase) e indiretamente controlam a morfologia e o fenômeno de relaxação, isto é, o comportamento total do polímero [25–27].

Os polímeros têm pouca ou nenhuma concorrência com outros tipos de materiais utilizados na maioria das aplicações médicas devido às suas propriedades únicas [28]:

1. Flexibilidade.
2. Resistência ao ataque bioquímico.
3. Boa biocompatibilidade.
4. Baixa densidade.
5. Disponível em uma ampla variedade de composições com propriedades físicas e mecânicas adequadas.
6. Podem ser facilmente fabricados em produtos com a forma desejada.

As aplicações dos polímeros na área médica são diversas e incluem engenharia de tecidos, implantação de dispositivos médicos e órgãos artificiais, próteses, oftalmologia, odontologia, reparo ósseo, entre outros [28].

O primeiro e mais importante requisito para a escolha de um biomaterial é a sua aceitação pelo corpo humano. O sucesso de um biomaterial ou implante é altamente dependente de três fatores principais [28]:

- 1) As propriedades (mecânicas, químicas e tribológicas) do biomaterial;
- 2) Biocompatibilidade do implante;
- 3) O estado de saúde do recetor e a competência do cirurgião.

Há uma grande variedade de polímeros que são utilizados em várias aplicações biomédicas nomeadamente: polietileno (PE), poliuretano (PU), politetrafluoretileno (PTFE), poliacetal (PA), polimetilmetacrilato (PMMA), politereftalato de etileno (PET), borracha de silicone (SR), polisulfona (PS), PEEK, ácido polilático (PLA) e ácido poliglicólico (PGA). Alguns exemplos de biomateriais compósitos de polímeros são hidroxiapatita/PE, sílica/SR, fibra de carbono/polietileno de ultra alto peso molecular (FC/ UHMWPE), fibras de carbono/ epóxi (FC/epóxi) e FC/PEEK [28].

Os biomateriais compósitos poliméricos estão divididos em compósitos ‘avital/avital’ e ‘vital/avital’. O compósito ‘avital/avital’ é um material feito de uma matriz não vital (não viva) e fases de reforço, já o compósito ‘vital/avital’ é composto por materiais vitais (vivos) e não

vitais (não vivos) [29]. Os compósitos avital / avital são divididos em biomateriais compósitos não reabsorvíveis, parcialmente reabsorvíveis e totalmente reabsorvíveis. Os biomateriais compósitos não reabsorvíveis são projetados para não se degradarem no ambiente *in vivo* (dentro do corpo). Eles são particularmente promissores para implantes de longo prazo. Por outro lado, os compósitos reabsorvíveis perdem a sua integridade mecânica em condições *in vivo*. Eles são particularmente promissores para implantes de curto prazo ou transientes, pois evitam uma segunda cirurgia para remoção dos dispositivos implantados [28].

Os materiais compósitos de polímeros apresentam alta resistência e propriedades elásticas desejadas. Os compósitos não reabsorvíveis são produzidos a partir de polímeros termofixos ou materiais compósitos termoplásticos. FC/epóxi, fibras de vidro (FV)/epóxi são alguns exemplos de compostos termofixos não reabsorvíveis. De modo a ter compósitos termoplásticos de boa qualidade, foram feitos vários estudos de desenvolvimento de placas ósseas compósitas termoplásticas não reabsorvíveis como, FC/PMMA, FC/PP, FC/PS, FC/PE, FC/nylon, FC/Polibutíleno Tereftalato (PBT) e FC/PEEK. Dos vários materiais investigados, o FC/PEEK é biocompatível, tem boa resistência à hidrólise e à degradação da radiação (método de esterilização) e outras propriedades promissoras como alta resistência à fadiga e inércia biológica, sem mutagenicidade ou carcinogenicidade [28].

2.4 Interação do plasma com o polímero

A interação do plasma com uma superfície polimérica resulta de processos como a absorção (ou reflexão) ou reação química do gás com a superfície. Estes processos fazem-se sentir devido às espécies ativas presentes no plasma, que podem ser fótons, espécies neutras ou partículas carregadas [30].

Fótons

Os fótons são originados a partir de descargas luminescentes e de arcos de plasma e apresentam uma gama de comprimentos de onda ampla no espectro eletromagnético, como mostra a tabela 2.2. Na zona dos infravermelhos, a energia dos fótons é muito baixa para interagir com o gás e como resultado dá-se a libertação de radiação que tem como efeito o aquecimento das paredes do reator e da superfície do material. Os fótons presentes na zona visível do espectro são mais energéticos e conseguem quebrar ligações moleculares e excitar átomos com ressonância. Na zona ultravioleta, os fótons são ainda mais energéticos e conseguem ionizar e excitar átomos e quebrar ligações de grandes cadeias poliméricas e de ligações moleculares [30].

Tabela 2.2- Energia dos fótons no espectro electromagnético (retirado de [30])

Região do espectro	Comprimento de onda (nm)	Gama energética (eV)
Infravermelho	$730 \leq \lambda \leq 10^6$	$0.00124 \leq E \leq 1.70$
Visível	$380 \leq \lambda \leq 780$	$1.59 \leq E \leq 3.26$
Ultravioleta	$13 \leq \lambda \leq 397$	$3.12 \leq E \leq 95.3$

Os fótons na gama ultravioleta e alguns na gama visível podem ser suficientemente energéticos para quebrar ligações atómicas ou moleculares na superfície do material e produzir radicais poliméricos livres. Os fótons na gama UV do plasma, com energia suficiente, podem modificar o estado molecular da superfície, através dos seguintes processos [30]:

- **Dissociação:** produção de um átomo individual ou um pequeno fragmento molecular a partir de uma molécula maior, como o polímero;
- **Rompimento:** quebra da cadeia molecular do polímero ou produção de duas ou mais cadeias menores;
- **Ramificação:** produção de cadeias poliméricas laterais;
- **Cruzamento de ligações:** produção de matrizes moleculares bidimensionais e tridimensionais pela formação de ligações entre moléculas adjacentes.

Estes processos podem ser induzidos por qualquer espécie ativa, desde que seja suficientemente energético.

Espécies neutras

O plasma consegue produzir grande variedade de espécies neutras ativamente energéticas, que são capazes de interagir fortemente com a superfície. Estas espécies incluem átomos reativos e espécies atómicas quimicamente muito reativas como H, O, F, Cl, etc. [30].

Partículas carregadas

O plasma produz partículas carregadas que tendem a ser aceleradas para as superfícies circundantes, com mais energia do que os eletrões ou iões negativos. As partículas carregadas incluem eletrões, que atingem o espaço circundante em igual número que o fluxo de iões. São produzidos ainda iões moleculares como OH^- , capazes de desencadear fortes reações químicas com a superfície [30].

2.5 Ativação e funcionalização de superfícies de polímeros

Quando o plasma entra em contato com a superfície do polímero, desencadeiam-se processos químicos e modificações físicas na superfície do mesmo, aumentando a reatividade, desencadeando o cruzamento de ligações ou o aumento do peso molecular. Desta forma, podem-se obter materiais com características específicas, como a molhabilidade, adesão, seletividade de material e até biocompatibilidade. Esta técnica de tratamento dos polímeros permite a modificação das características da superfície, sem comprometer as propriedades de massa ou volume dos mesmos [31].

A ativação da superfície do polímero é levada a cabo pelo plasma de gases como o O_2 , N_2 , NH_3 e pelos gases inertes. O bombardeamento de partículas energéticas quebra as ligações covalentes na superfície, o que leva a formação de radicais de superfície, que podem reagir com as espécies ativas do plasma e formar diferentes grupos funcionais, quimicamente ativos na superfície. Os contaminantes e as camadas de polímeros com ligações fracas podem dissociar-se em produtos voláteis, que são expelidos para longe da superfície. A exposição ao plasma de oxigênio ou azoto durante vários minutos torna a maioria das superfícies poliméricas hidrofílicas. As espécies ativas atacam a superfície do polímero e causam a incorporação de grupos hidrofílicos como o carbonilo, carboxilo, hidroxilo ou amino [31].

2.6 Titânio/Dióxido de Titânio

Os materiais baseados em titânio têm sido usados principalmente em implantes dentários e ortopédicos, por apresentarem excelente compatibilidade biológica, elevada resistência mecânica e alta resistência à corrosão [32].

As ligas de titânio têm ganho uma importância crescente na medicina, principalmente devido à biocompatibilidade que o caracteriza. Um dos principais problemas das ligas de titânio é ainda a questão da obtenção de uma conexão duradoura entre o implante e o tecido ósseo, que após o uso prolongado não resulte no enfraquecimento do implante [33].

O dióxido de titânio (TiO_2), tem várias aplicações relacionadas com catálise, eletrônica, fotônica, medicina e libertação controlada de fármacos. Também é usado em vários campos como células solares e revestimentos óticos, devido ao seu elevado índice de refração, amplamente utilizado em dispositivos de memória, devido à sua elevada constante dielétrica. TiO_2 é um dos fotocatalizadores mais utilizados em aplicações antibacterianas, purificação de água, decomposição de vários poluentes orgânicos, por causa da sua natureza não tóxica, elevada estabilidade química e facilidade de produção em massa [34, 35].

Nos últimos anos, os desenvolvimentos industriais têm gerado exigências de tecnologias de materiais focadas na melhoria da superfície das peças industriais. Assim, os metais de transição, como o titânio, têm sido utilizados para melhorar as propriedades da superfície tais como o desgaste e a resistência à corrosão [36].

3 Materiais e Métodos

Este capítulo descreve as características dos materiais e métodos utilizados neste trabalho, bem como o procedimento experimental associado.

3.1 Materiais

Tal como foi referido anteriormente, neste trabalho foram utilizados os materiais poliméricos Poliéter éter cetona (PEEK) e Polietileno de alta densidade (PEAD), de forma a estudar a sua aplicabilidade em próteses ortopédicas.

- Poliéter éter cetona (PEEK)

O PEEK é um polímero termoplástico semi-cristalino pertencente à família dos poliariletercetonas (PAEK). Quando comparado com outros polímeros, o PEEK apresenta maior resistência à degradação química, física, térmica e também ao ataque de substâncias inorgânicas e orgânicas. Além disso, tem a vantagem de poder ser moldado em muitas formas diferentes, devido às suas excelentes propriedades mecânicas, que se assemelham às do osso humano [37, 38]

O PEEK é um material promissor alternativo aos biomateriais metálicos e devido às suas propriedades tem várias aplicações em diferentes tipos de indústria. No entanto, a característica principal de um biomaterial deve ser a sua biocompatibilidade, a adesão das células ao polímero, que também deve ser mecanicamente estável e biodegradável. Assim, o PEEK reúne a maioria destas características, porém com a desvantagem de possuir fracas propriedades adesivas, porque como muito outros polímeros, possui pouca energia livre superficial, que resulta em baixa adesão. Este polímero já tem sido comercializado para implantes ortopédicos, como na reconstrução óssea após trauma ou na substituição de vértebras [38– 40].

- Polietileno de alta densidade (PEAD)

O polietileno é um polímero parcialmente cristalino, flexível, cujas propriedades são acentuadamente influenciadas pela quantidade relativa das fases amorfa e cristalina. É inerte face à maioria dos produtos químicos comuns, devido à sua natureza parafínica, ao seu elevado peso molecular e à sua estrutura parcialmente cristalina [41].

O polietileno de alta densidade apresenta uma boa resistência à alteração do meio a baixas temperaturas e excelente resistência química. É um material com boa resistência mecânica e

com uma estrutura altamente cristalina, porém é suscetível a quebra por stress, baixa resistência ao UV e é pouco maleável [42].

3.2 Métodos

Descarga de Barreira Dielétrica (DBD)

A descarga de barreira dielétrica, ou simplesmente descarga de barreira, é conhecida há mais de um século. As primeiras investigações experimentais foram reportadas por Siemens em 1857 e concentravam-se na geração do ozono, que foi conseguida submetendo um fluxo de oxigénio ou ar à influência de um campo elétrico alternado entre dois tubos de vidro coaxiais, gerando assim uma descarga luminescente. A principal característica do aparelho é o facto dos eléktodos não entrarem em contacto com os gases na câmara de descarga. Diversos estudos realizados em 1970, utilizando modernas ferramentas de diagnóstico e modelos matemáticos possibilitaram uma melhor compreensão dos processos físicos e químicos do plasma na geração do ozono, que resultaram não apenas em geradores de ozono melhorados, mas também numa série de recursos adicionais como a modificação de superfícies, controlo de poluição e mais recentemente em telas planas de grande dimensão usadas em aparelhos de televisão [43].

A descarga de barreira dielétrica é o tipo de descarga que ocorre entre dois eléktodos metálicos, na presença de pelo menos um dielétrico, entre os mesmos e com tensões alternadas para o seu funcionamento. Na figura 3.1 estão representadas as configurações típicas da DBD. O material dielétrico pode apresentar uma configuração planar ou cilíndrica, sendo que a zona de descarga (*gap* de descarga) pode variar entre 0,1 mm a cerca de 100 mm, dependendo da aplicação. O dielétrico, sendo um isolador, não permite a passagem de corrente contínua. A sua constante dielétrica e a sua espessura, em combinação com a derivada da tensão aplicada em função do tempo (dV/dt), determina a quantidade de corrente que pode passar pelo dielétrico. Para transportar corrente na zona de descarga, o campo elétrico deve ser suficientemente alto de modo a romper a rigidez dielétrica do gás. Na maioria das aplicações o dielétrico limita a densidade média de corrente na zona de descarga, em que nos casos ideais não há consumo de energia. Os materiais mais adequados para barreira dielétrica são vidro ou quartzo, em casos especiais, materiais cerâmicos ou camadas finas de esmalte ou polímero, pois apresentam baixa perda dielétrica. Em frequências muito elevadas, a limitação de corrente pelo dielétrico torna-se menos eficiente e assim, as DBD operam normalmente entre a frequência da rede e cerca de 10 MHz. Quando o campo elétrico na zona de descarga é suficientemente elevado para romper a rigidez dielétrica, na maioria dos gases, um grande número de microdescargas são observadas quando a pressão é da ordem de 10^5 Pa. Esta gama de pressão é a mais apropriada para a geração de ozono, assim como para o tratamento de gases de combustão e controlo de poluição

[33, 44, 45].

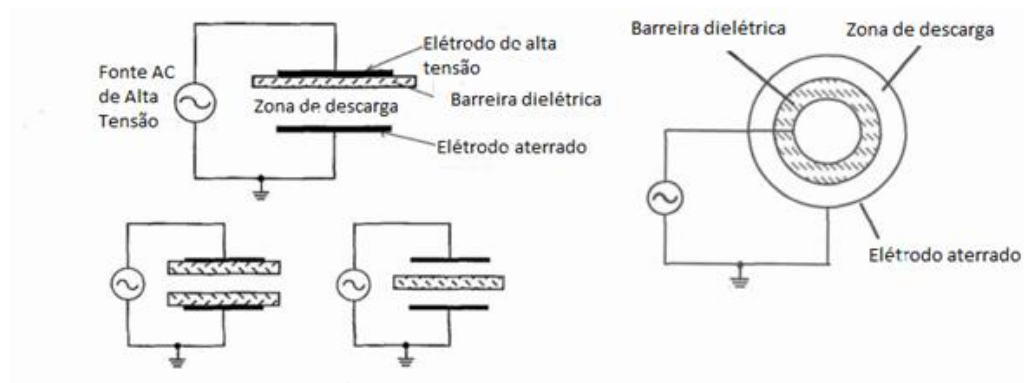


Figura 3.1- Configurações típicas de descarga de barreira dielétrica (Adaptado de [46]).

A produção do plasma a partir de uma descarga de barreira dielétrica depende das condições do sistema. Para tal é importante compreender os processos envolvidos numa descarga, tal como ilustrado na figura 3.2. A primeira etapa do processo de descarga corresponde à quebra da rigidez dielétrica do gás, tornando-o condutor. Embora a quebra seja um processo bastante complexo, que depende fortemente das condições do sistema, este começa sempre com uma avalanche de eletrões, isto é, a multiplicação de alguns eletrões primários originando uma cascata ionizante, quando acelerados pelo campo elétrico. Após esta fase inicial, o desenvolvimento da descarga depende de vários parâmetros como a composição do gás, a pressão, a distância entre os eletrodos, a frequência do campo aplicado e a geometria do sistema utilizado. Para uma pressão suficientemente baixa, o livre percurso médio dos eletrões é longo e a avalanche inicial prossegue até que o plasma é formado no *gap* de descarga (zona de descarga). Por outro lado, quando a pressão é suficientemente elevada, o livre percurso médio dos eletrões é drasticamente reduzido e a avalanche pode gerar um grande número de eletrões extras originando cargas localizadas espacialmente que se propagam no *gap* de descarga, criando canais condutores conhecidos como *streamers*. Caso a corrente elétrica do sistema não seja limitada, ou seja, se sofrer um aumento progressivo, os *streamers* dão origem a arcos de descarga ou arcos elétricos [19].

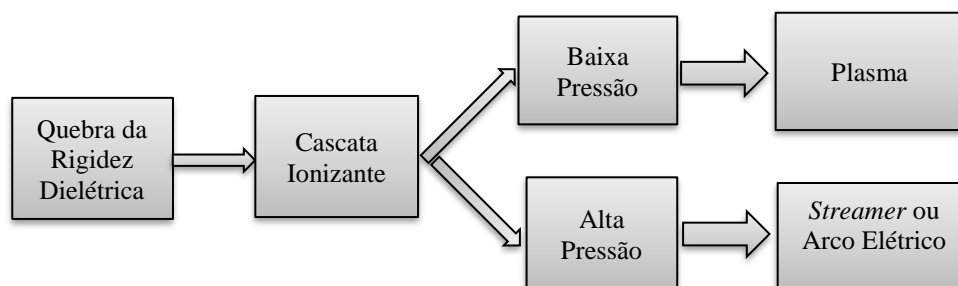


Figura 3.2- Etapas envolvidas no processo de descarga de barreira dielétrica

Existem basicamente dois regimes diferentes de operação de DBD: O regime difuso (a) e regime filamentar (b), exemplificados na figura 3.3.

Na maior parte das aplicações industriais, as descargas produzidas pela técnica DBD são geradas no modo filamentar. Neste processo, a quebra da rigidez do gás dá-se em vários pontos diferentes, seguidos da geração de filamentos designados de microdescargas. As microdescargas são de duração de nanossegundos, uniformemente distribuídas sobre a superfície dielétrica[20]. Este regime de operação da DBD produz uma grande variedade de radicais livres, moléculas, átomos, eletrões com grande energia e radiação ultravioleta que, quando interagem com a superfície dos materiais, podem causar a mudança na topografia da superfície (rugosidade), o aumento da molhabilidade devido à formação de grupos funcionais de oxigénio e azoto na superfície tratada e também pode agir na esterilização do material [47].

No regime difuso, a descarga é mais homogénea, sem a formação de filamentos e exige condições especiais de operação que são principalmente determinadas pelo gás utilizado, pela tensão aplicada e pela frequência. Estas descargas são obtidas mais facilmente em gases como o hélio, o néon, o azoto ou o árgon a baixa pressão. Portanto, o uso destes gases é muito mais vantajoso para tratamento e esterilização de materiais, pois o plasma gerado por ionização desses gases garante a uniformidade do tratamento por ter uma maior facilidade de gerar o plasma em regime difuso [15, 19].

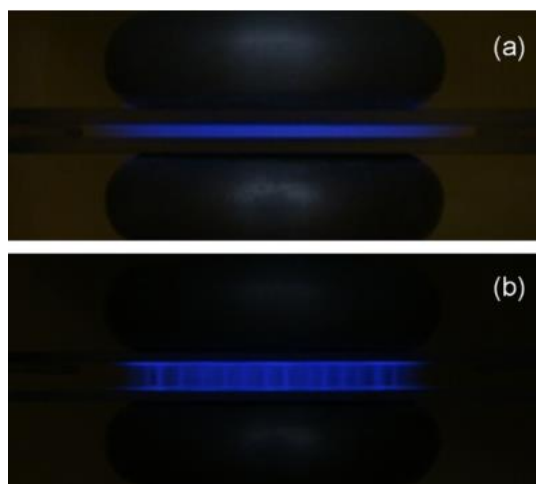


Figura 3.3- Regimes de operação do plasma por DBD: (a) - Regime difuso; (b) - Regime filamentar. (retirado de [47])

Reator de plasma DBD para funcionalização de polímeros

O equipamento utilizado para a funcionalização dos polímeros foi um reator cilíndrico de plasma DBD, construído no Laboratório de Plasmas e Aplicações do CEFITEC da FCT/UNL.

Este reator, cujo esquema se encontra representado na figura 3.4, foi projetado para operar em regime difuso, desde a pressão atmosférica até 1 mbar, sob atmosfera controlada. Os eletrodos estão conectados a uma fonte de alta tensão, através dos contatos nas extremidades.

As tampas do reator são em poliamida, fixadas com o auxílio de parafusos, de modo a tornar a vedação mais eficiente. A tampa superior contém 4 orifícios (1 a 4 da figura 3.7), com as seguintes funções [16]:

- 1 – Entrada do gás, efetuado através de um tubo de aço inoxidável, com um diâmetro de 5mm, até a região do plasma;
- 2 – Saída em que está acoplada uma bomba rotatória;
- 3 – Nesta saída encontra-se instalado um *pirani* responsável pela medição e controle da pressão interna do reator;
- 4 – Neste orifício encontra-se o condutor elétrico que estabelece o contato entre o eletrodo superior e a fonte de tensão (5 e 6 da figura 3.4, respectivamente).

Utilizou-se como material dielétrico, uma placa de petri de borossilicato (7 da figura 3.4). O reator está ligado a uma fonte de alta tensão, de média frequência, *Eni Power Systems Plasmaloc 2-HF*, regulável em potência.

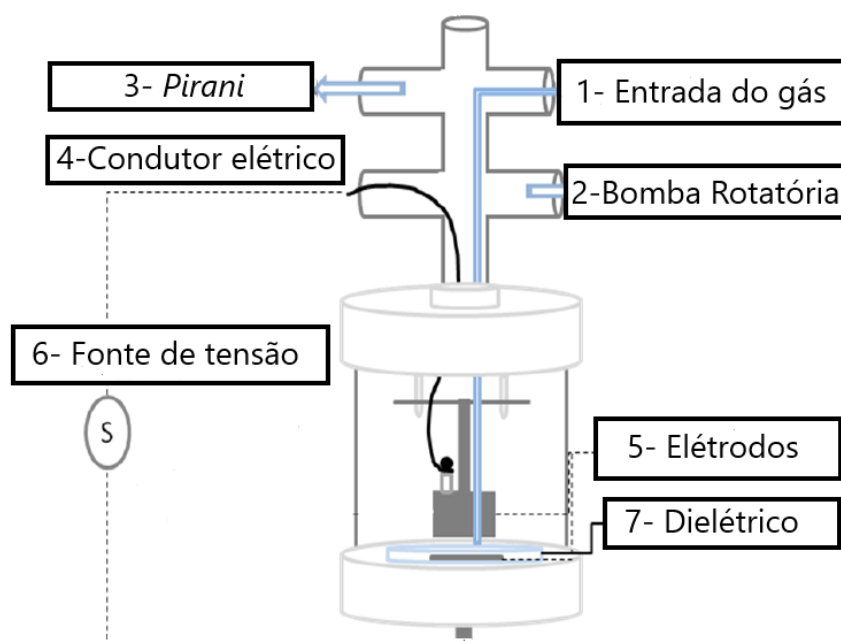


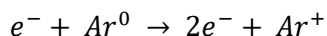
Figura 3.4- Reator de plasma DBD para a funcionalização de polímeros (adaptado de [16])

Pulverização catódica – *Sputtering*

A pulverização catódica ou *sputtering* é uma técnica puramente física, usada na deposição de filmes finos em ambiente de vácuo. Neste processo, uma descarga de gás, normalmente argon, origina um plasma utilizado para ejetar átomos de um alvo (neste trabalho, o titânio). A configuração típica da técnica de pulverização catódica está representada na figura 3.5, em que os iões positivos do argon são acelerados em direção ao cátodo, carregado negativamente, onde

a energia dos iões é transferida para o material a ser depositado (alvo), ejetando átomos. Esses átomos são projetados em todas as direções, incluindo o substrato (ânodo) onde se depositam e condensam, dando origem a um filme fino [15, 48].

Este processo de descarga é autossustentado, dado que os portadores de carga são produzidos através do processo de colisão entre os átomos de árgon e eletrões, que resultam da ionização dos átomos e que dá origem a iões positivos de árgon e um eletrão, além do eletrão inicialmente existente:



Ambos os eletrões são acelerados pelo campo elétrico aplicado e ganham energia suficiente para ionizar mais átomos neutros de árgon, resultando num efeito de avalanche. Uma vez iniciada a pulverização, o alvo liberta eletrões secundários que são acelerados no sentido do ânodo, onde colisões com os átomos neutros do árgon, produzem mais iões, que sustentam ainda mais a descarga [12].

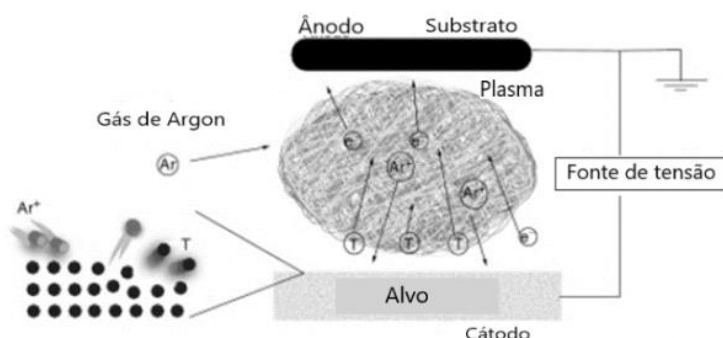


Figura 3.5- Processo de pulverização catódica (retirado de [12])

Pulverização catódica assistida por cátodo magnetrão

No sistema de pulverização catódica, nem todos os eletrões contribuem na ionização. Através do uso de campos magnéticos colocados atrás do alvo, esses eletrões podem ser confinados perto da superfície do alvo, como mostra a figura 3.6. As linhas de campo magnéticas criadas induzem os eletrões a descreverem órbitas helicoidais em torno destas mesmas linhas. Este percurso, embora restrito às proximidades do alvo, permite que exista uma maior probabilidade de colisão entre os eletrões e átomos do gás. Este processo leva a um aumento da ionização do árgon, permitindo assim uma maior taxa de pulverização a pressões mais baixas de árgon. Como a pressão na câmara é mais baixa, há um decréscimo na contaminação e um aumento na eficiência de deposição [15], [48, 49].

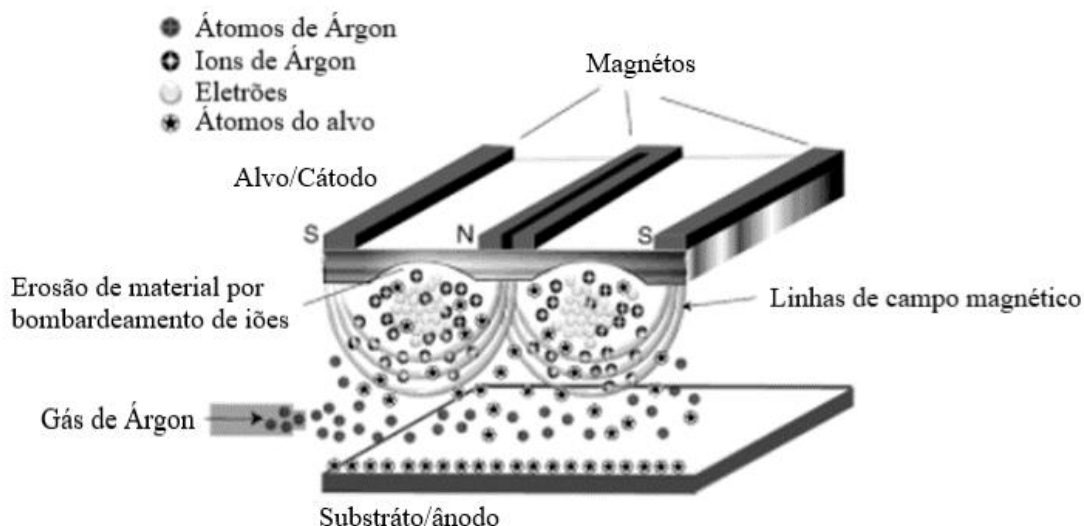


Figura 3.6- Processo de pulverização catódica assistida por cátodo magnetrão (retirado de [12]).

Sistema de deposição de filmes finos de titânio

A deposição de filmes finos de dióxido de titânio sobre a superfície dos polímeros foi realizada pelo método de pulverização catódica assistida por cátodo magnetrão, onde se utilizou o sistema representado na figura 3.7. Este sistema, é constituído por uma câmara de vácuo, onde se dará a deposição dos filmes, a pressões baixas (10^{-3} a 10^{-2} mbar). Contém no seu interior uma base para os substratos (ânodo) onde se dá a deposição e o cátodo magnetrão onde foi montado o alvo de titânio. Como gases de trabalho foram utilizados o argon e o oxigénio, em que os fluxos de entrada foram controlados a partir de válvulas de agulha. Conta ainda com uma bomba rotatória *Edwards E2M18* para efetuar o vácuo primário, uma bomba turbomolecular *Pfeiffer TMH 1001 P* e o seu painel de controle para o alto vácuo, dois vacuómetros, *Pirani* e *Penning* com os seus respetivos painéis de controlo e uma fonte de tensão (DC) da marca *Huttinger*, modelo PFG 1000 DC (atingindo uma potência máxima de 10 kW, uma tensão máxima de 1000 V e sendo a corrente máxima de 12,5 A), sendo responsável pela alimentação do cátodo. Na parte inferior encontram-se as tubagens de água responsáveis pelo arrefecimento do cátodo e da bomba turbomolecular [50].

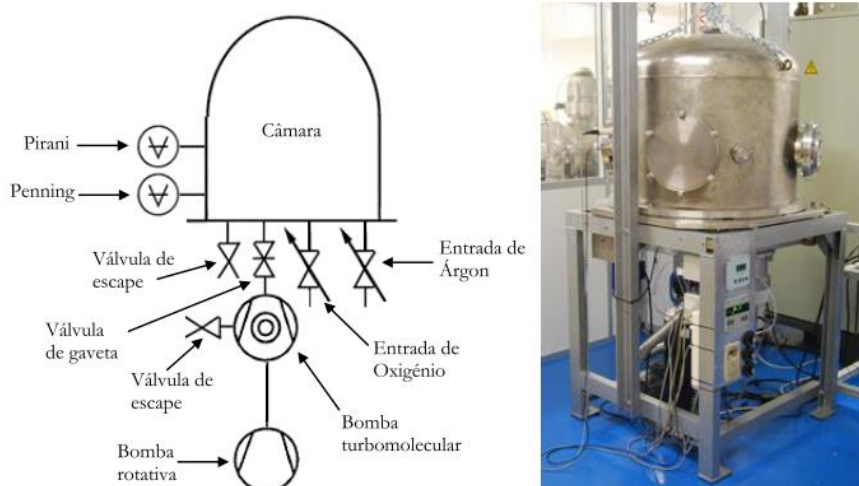


Figura 3.7- Sistema de pulverização catódica para a deposição de filmes de óxido de titânio (retirado de [57])

As características dos alvos de titânio utilizados estão apresentadas na tabela 3.1.

Tabela 3.1- Características dos alvos de titânio utilizados

Marca	Diâmetro(mm)	Espessura (mm)	Pureza (%)
<i>Goodfellow</i>	64,5	3,18	99,6

3.3 Técnicas de caracterização

Existem várias técnicas de caracterização, porém, no contexto desse trabalho, são abordadas as seguintes: medidas de ângulo de contato, difração de raios-X, microscopia eletrônica de varrimento, citotoxicidade e teste de adesão das células e marcação com DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol).

Molhabilidade: Medidas de Ângulo de Contato

A molhabilidade é um fenômeno físico universal com importantes efeitos na natureza e na vida humana. Ela ocorre quando um líquido entra em contato com um sólido e a camada líquida se estende ao longo da superfície do sólido. Em 1805 Thomas Young foi o primeiro a descrever os conceitos da molhabilidade e do ângulo de contato [45, 51].

O principal índice utilizado para avaliar a molhabilidade de uma superfície sólida é o ângulo de contato. O ângulo de contato descreve o comportamento de uma gota de líquido numa superfície sólida no ar, e é definido como o ângulo entre a tangente no ponto das três fases e a superfície sólida. Quando a energia superficial de um substrato sólido é maior do que a de um substrato molhado, o líquido espalha-se completamente na superfície, de modo a diminuir a sua energia.

Contrariamente, quando a energia superficial do substrato seco é menor, o líquido molha a superfície parcialmente, formando gotas. Quando o líquido e o vapor estão em contato entre si, juntamente com a superfície sólida, observa-se a existência de uma linha comum para as três fases, conhecida como linha de contato, como se observa na figura 3.8 [19, 45, 51].

Geralmente, superfícies sólidas com ângulo de contato inferior a 90° ($\theta_c < 90^\circ$) são consideradas hidrofílicas, enquanto as superfícies com ângulo de contato superior a 90° ($\theta_c > 90^\circ$) são consideradas hidrofóbicas. A relação entre o ângulo de contato e as tensões superficiais pode ser descrita pela equação de Young, dada por:

$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} - \gamma_{LV} \cos \theta_c = 0 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde θ representa o ângulo de contato, γ_{SV} é a tensão superficial entre o sólido e o vapor, γ_{SL} é a tensão superficial entre o sólido e o líquido e γ_{LV} é a tensão superficial entre o líquido e o vapor (representadas na figura 3.8) [19, 21, 45, 48].

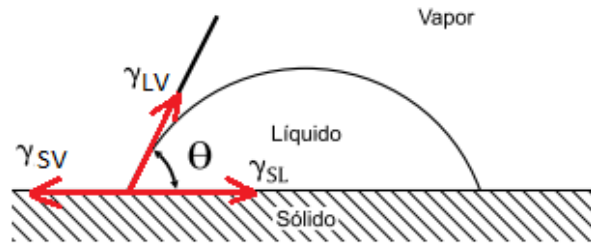


Figura 3.8- Representação do ângulo de contato e das tensões superficiais de um líquido sobre uma superfície sólida (adaptado de [51])

Difração de Raios-X

Nos últimos anos, a difração de raios-X tornou-se uma técnica cada vez mais importante para análises qualitativas e quantitativas, bem como para estudos fundamentais das propriedades e estruturas dos polímeros [49].

Max Von Laue, em 1912, descobriu que substâncias cristalinas atuam como redes de difração tridimensionais para comprimentos de onda de raios-X semelhantes ao espaçamento dos planos em uma rede de cristal. A difração de raios-X é uma técnica comum para o estudo de estruturas cristalinas e espaçamento atômico. É baseada na interferência construtiva de raios-X monocromáticos e uma amostra cristalina. A interação dos raios incidentes com a amostra produz interferência construtiva (e um raio difratado), quando as condições satisfazem a lei de Bragg, dada pela equação 2:

$$n\lambda = 2d \sin(\theta) \quad (\text{Equação 2})$$

E Esta lei relaciona o comprimento de onda (λ) da radiação eletromagnética com o ângulo de difração θ e o espaçamento da rede em uma amostra cristalina d ; o n corresponde à ordem de difração. Os materiais cristalinos apresentam padrões bem definidos, não sendo o que se observa, geralmente, para os polímeros que apresentam reflexões de *Bragg* largas e com um padrão difuso, evidenciando a coexistência de regiões ordenadas e desordenadas no material [49, 52, 53].

O difractor de raios-X utilizado neste trabalho foi o *PANalytical's X'Pert PRO MDR*, da CENIMAT-13N. Como radiação incidente utilizou-se a linha $K\alpha$ de uma ampola de cobre. Para o registo dos difractogramas, foi feito um varrimento contínuo com uma variação de ângulo 2θ , entre 10° e 70° , com um passo de 0.033° (2θ) e um tempo de aquisição de 33s/passo.

Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)

A técnica de microscopia eletrónica de varrimento é uma das mais versáteis técnicas para a observação e análise de características microestruturais de materiais sólidos [54].

As imagens tridimensionais de alta resolução produzidas pela técnica de SEM fornecem informações topográficas, morfológicas e de composição, aumentando o campo de aplicações científicas e industriais [55, 56].

O microscópio eletrónico de varrimento (SEM - *Scannig Electron Microscopy*) utiliza um feixe focado de eletrões de elevada energia para gerar uma variedade de sinais na superfície de espécimes sólidos. Os sinais que derivam de interações dos eletrões com a amostra revelam informações sobre a amostra, incluindo a morfologia, composição química e estrutura cristalina e orientação dos materiais que compõem a amostra. Na maioria das aplicações, os dados são coletados para uma área selecionada da superfície da amostra e é gerada uma imagem bidimensional que exhibe variações espaciais nessas propriedades [55, 56].

Para este trabalho utilizou-se o microscópio eletrónico de varrimento *JEOL JSM-7001F* pertencente ao MicroLab, do Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa. A utilização desse microscópio deveu-se a análise da superfície dos filmes de TiO_2 , a determinação da sua espessura e também a verificação da presença do titânio e oxigénio em algumas das amostras, isto é, confirmar que realmente se tratava de um filme de TiO_2 .

Para efetuar esta análise, os filmes foram previamente revestidos por um filme de cromo, com uma espessura de 27 nm. Esse revestimento torna a superfície dos filmes mais condutora, pois o filme em si, não o é, o que não permite a sua observação pelo SEM. A deposição deste filme foi efetuada por *sputtering* durante 60 segundos a uma taxa de deposição de 27nm/s. Com o SEM, foi possível obter imagens da secção transversal, que posteriormente permitiram a determinação da espessura dos filmes.

Citotoxicidade

Quando se fala de biomateriais para aplicações médicas, um dos fatores a considerar é a sua biocompatibilidade e, neste sentido é importante fazer testes que possam dar esta informação. O método utilizado para avaliar a citotoxicidade dos biomateriais produzidos foi o método do extrato. Este método permite saber se um material não é citotóxico, e em caso afirmativo permite determinar qual o grau de citotoxicidade. A avaliação da citotoxicidade pelo método de extrato é efetuada por cultura de células, neste trabalho as células usadas foram as células Vero e as etapas envolvidas estão explicadas mais à frente na secção procedimento experimental.

Teste de adesão das células e marcação com DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol)

De uma forma geral e tal como mencionado anteriormente os polímeros possuem uma fraca capacidade de adesão às células. Uma das formas de aumentar as suas capacidades adesivas é modificar as suas propriedades superficiais. Após a alteração das propriedades superficiais dos materiais utilizados neste trabalho foi necessário avaliar as suas taxas de adesão celular. Para tal efetuou-se uma cultura de células de osteoblastos, SAOS-2, (anexo 2) e avaliou-se a adesão destas aos biomateriais previamente produzidos e modificados.

A molécula de DAPI é um marcador fluorescente que se liga fortemente à molécula de DNA. Esta molécula atravessa a membrana celular sem a danificar, sendo usada para visualizar os núcleos em células mortas ou vivas. Em microscopia de fluorescência esta molécula é excitada com radiação ultravioleta e emite radiação na zona do azul. Desta forma, a marcação com DAPI permitiu verificar os núcleos das células de osteoblastos que aderiram ao biomaterial, evidenciando assim a adesão das células aos materiais em estudo.

3.4 Procedimento experimental

Funcionalização do PEEK e do PEAD por Descarga de Barreira Dielétrica

O primeiro passo antes da funcionalização dos polímeros PEEK e PEAD consiste em moldar os polímeros, que estão sob a forma de grânulos, em filmes. O processo de molde dos polímeros engloba as seguintes etapas:

1. Ligar a placa de aquecimento (*Round Hotplates* nº 1000718) até à temperatura de fusão dos polímeros (PEEK ~ 350 °C, PEAD ~ 140 °C);
2. Colocar os grânulos dos polímeros entre folhas de poliamida (*Kapton®*, *DuPont*), sobre a placa de aquecimento;

3. Depois dos polímeros atingirem o ponto de fusão, com uma espátula são moldados a quente em forma de filme. Na figura 3.9 é apresentada uma imagem dos polímeros antes e depois do molde no formato desejado.

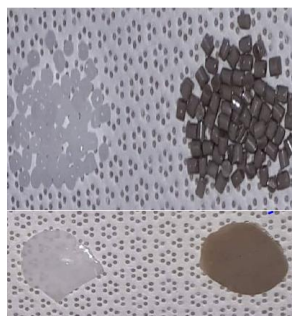


Figura 3.9- Imagem em cima- PEAD (branco), PEEK (castanho) em grânulos, imagem em baixo PEAD e PEEK em filme.

Depois de serem previamente lavados com acetona, isopropanol e água ultrapura e secos com um jato de azoto industrial (*Air Liquide*), foram registados os ângulos de contato através do medidor de ângulos de contato marca *ramé-hart* modelo 100-00-230. Este procedimento limpeza foi utilizado antes de qualquer ensaio de funcionalização por descarga de barreira dielétrica.

Para dar início à funcionalização seguiu-se os seguintes passos:

- Coloca-se os filmes de PEEK ou PEAD numa placa de petri de borossilicato entre os elétrodos a uma distância de 4 mm;
- Através de uma bomba rotatória, o reator de DBD é bombeado até atingir $1,3 \times 10^{-3}$ mbar;
- Depois de atingir essa pressão é permitida a entrada de um fluxo de árgon (99% de pureza, *Air Liquide*) através de uma válvula de agulha até atingir 1,0 mbar;
- Tendo as condições anteriores garantidas, liga-se a fonte de tensão e cronometra-se o tempo de funcionalização desejado.

Nas tabelas 3.2 e 3.3 são apresentados os parâmetros de funcionalização utilizados.

Tabela 3.2- Parâmetros utilizados na funcionalização do PEEK

Frequência (Hz)	Pressão (mbar)	Potência (Watt)	Impedância (Ω)	Pressão árgon (mbar)	Tempo (minuto)
450	$1,3 \times 10^{-3}$	32	600	1,0	10
450	$1,3 \times 10^{-3}$	32	600	1,0	30
450	$1,3 \times 10^{-3}$	32	600	1,0	60

Tabela 3.3- Parâmetros utilizados na funcionalização do PEAD

Frequência (Hz)	Pressão (mbar)	Potência (Watt)	Impedância (Ω)	Pressão árgon (mbar)	Tempo (minuto)
450	$1,3 \times 10^{-3}$	28	600	1,0	30
450	$1,3 \times 10^{-3}$	28	600	1,0	60

Depois de funcionalizados, procedeu-se novamente ao registo dos ângulos de contato em diferentes períodos de tempo e repetiu-se os ensaios de acordo com a tabela 4.3.

Tabela 3.4- Réplicas efetuadas na funcionalização do PEEK e PEAD

Tempo (min)	Réplicas PEEK	Réplicas PEAD
10	5	-
30	5	3
60	5	3

Para o PEAD os tempos de funcionalização foram de 30 e 60 minutos, pois como o seu ângulo de contato é superior ao do PEEK, então é necessário um maior tempo de funcionalização para se obter uma alteração significativa do ângulo de contato.

Deposição de filmes de dióxido de titânio no PEEK e PEAD através da técnica pulverização catódica

Antes de ser efetuada a deposição dos filmes de TiO_2 no PEEK e no PEAD, procedeu-se à deposição em lâminas de vidro de forma a avaliar as condições mais adequadas para deposição nos polímeros. Os parâmetros de deposição foram escolhidos de acordo com as várias experiências já realizadas nesse laboratório para deposição de filmes de TiO_2 e de acordo com os resultados obtidos nos vários ensaios realizados, de modo a permitir um melhor conhecimento sobre o funcionamento do sistema de pulverização catódica.

As lâminas de vidro foram partidas ao meio, lavadas sequencialmente com acetona, isopropanol e água ultrapura e por fim foram secas com um jato de azoto industrial (*Air Liquide*).

Após a limpeza, as lâminas foram inseridas no interior da câmara de vácuo, por baixo do cátodo, a 10 cm de distância, posicionando-as na horizontal, uma ao lado da outra e centradas relativamente ao cátodo magnetron.

A realização de vários ensaios nas lâminas de vidro, permitiu escolher de acordo com o objetivo pretendido e as condições de funcionamento do sistema, os parâmetros adequados para o depósito do filme de TiO_2 na superfície dos polímeros PEEK e PEAD.

Tal como na funcionalização por DBD, para efetuar o depósito de filmes de dióxido de titânio, também é necessário ter o PEEK e o PEAD em forma de filmes, sendo este um dos passos a realizar primeiro, seguido do processo de limpeza anteriormente descrito.

Depois de ter-se os substratos em condições adequadas para o depósito, seguiram-se os seguintes passos:

- O primeiro ponto é garantir que a pressão na câmara de vácuo atinja a ordem de 10^{-6} a 10^{-5} mbar, e para tal, é necessário garantir que câmara fica bem fechada, para que não haja fugas, fechar as válvulas de escape, abrir a válvula de gaveta, ligar a bomba rotatória e quando atingir pressões da ordem de 10^{-1} mbar então ligar a bomba turbomolecular.
- Quando a pressão na câmara atingir $\sim 10^{-6}$ a 10^{-5} mbar, a qual designa-se de pressão de limpeza, P_L (pois limpa a maior parte das partículas do ar, proporcionando uma atmosfera limpa), então fecha-se a válvula de gaveta, até um determinado ponto e volta-se a abrir $\frac{1}{4}$.
- Neste passo segue-se a entrada do fluxo de argon pretendido, para tal, abre-se a válvula de entrada de argon e com a válvula de agulha coloca-se a pressão total desejada, P_T .

- Antes de efetuar o depósito no substrato, é importante limpar o alvo. Deixa-se o *shutter* entre o alvo e o substrato, liga-se a fonte de tensão, onde escolhe-se a potência desejada, P, liga-se a descarga (ver figura 3.10) e cronometra-se o tempo de limpeza desejada. Neste trabalho os tempos de limpeza foram de 1 a 3 minutos.
- Tendo terminado a limpeza, está-se em condições de iniciar o depósito. O procedimento é semelhante à limpeza do alvo, porém para que o filme seja depositado na superfície do polímero é necessário tirar o *shutter* da frente do alvo, e para tal, recorre-se a uma válvula que se encontra no exterior da câmara.
- Como se pretende um filme de TiO_2 é necessário também um fluxo de oxigénio (*Air Liquide*, pureza 99%), logo abre-se a válvula de entrada de oxigénio e com auxílio da válvula de agulha do mesmo, controla-se a percentagem de oxigénio pretendida. A percentagem restante corresponde ao árgon, recorrendo à abertura da válvula de agulha do mesmo.
- Após terem sido definidos os parâmetros de depósito, pressão total, percentagem de oxigénio, potência, liga-se a fonte de alta tensão (ver figura 3.11) e cronometra-se o tempo pretendido.
- Quando o tempo total é atingido desliga-se a fonte de tensão, fecham-se as entradas de gás e fecha-se a válvula de gaveta.



Figura 3.11- Descarga de árgon durante a limpeza do alvo.



Figura 3.10-Descarga de TiO_2 durante o depósito.

Os parâmetros de deposição utilizados para a deposição de filmes de TiO_2 no PEEK e no PEAD encontram-se nas tabelas 4.4 e 4.5, respetivamente

Nas tabelas 3.5 e 3.6 são apresentados os parâmetros de deposição utilizados.

Tabela 3.5- Parâmetros de deposição de filmes TiO₂ utilizados no PEEK

O₂ (%)	Pressão Total (mbar)	Potência (Watt)	Tensão (V)	Corrente (A)	Tempo (minuto)
25	2,2 x 10 ⁻²	1000	513	1,97	80
50	2,2 x 10 ⁻²	1000	494	2,07	80
75	2,2 x 10 ⁻²	1000	490	2,07	80
100	2,2 x 10 ⁻²	1000	470	2,17	80
25	2,2 x 10 ⁻²	1500	580	2,66	80
50	2,2 x 10 ⁻²	1500	505	3,05	80
75	2,2 x 10 ⁻²	1500	544	2,80	80
100	2,2 x 10 ⁻²	1500	505	3,05	80

Tabela 3.6- Parâmetros de deposição de filmes TiO₂ utilizados no PEAD

O ₂ (%)	Pressão total (mbar)	Potência (Watt)	Tensão (V)	Corrente (A)	Tempo (minuto)
25	2,2 x 10 ⁻²	500	466	1,14	25
50	2,2 x 10 ⁻²	500	478	1,14	25
75	2,2 x 10 ⁻²	500	474	1,14	25
100	2,2 x 10 ⁻²	500	474	1,14	25
25	2,2 x 10 ⁻²	1000	529	1,92	25
50	2,2 x 10 ⁻²	1000	505	2,02	25
75	2,2 x 10 ⁻²	1000	498	2,07	25
100	2,2 x 10 ⁻²	1000	494	2,07	25

Determinação da citotoxicidade do PEEK e do PEAD pelo método do extrato

A determinação da citotoxicidade de um material pelo método do extrato engloba as seguintes etapas:

- No primeiro dia deste processo, foi feita a preparação dos extratos: para tal, utilizou-se a razão 6 cm²/mL para cada material, segundo a norma ISO 10993-12. Os extratos foram preparados colocando-se os materiais (PEEK ou PEAD) imersos num determinado meio de cultura, durante um tempo mínimo de 24h a 37°C. O meio de cultura utilizado nestes ensaios foi o DMEM cuja composição se encontra especificada no anexo 1.

- No segundo dia foi feita a sementeira das células Vero: o primeiro passo consistiu em observar e fotografar as células nos frascos de cultura, de modo a verificar se estas se encontravam em condições adequadas para a sementeira. Caso tal se verificasse procedia-se à tripsinização das células e de seguida, à sua contagem, tendo-se utilizado para tal um hemocítmetro. Depois de saber o número de células existentes, calcula-se o número de células e o volume de meio que é necessário preparar para a sementeira, tendo em conta o número de poços em que se irão semear as células. É necessário considerar também que cada poço da microplaca de 96 poços tem uma

área de 0,3 cm², que se pretende semear 20 k células/cm² e que cada poço leva 0,1 mL de meio. Para este trabalho utilizaram-se 96 poços de sementeira, o que corresponde a 6k células/poço e a um total de 576k células, sendo necessários 9,6 mL de meio para os 96 poços. Utilizaram-se duas microplacas de 96 poços, uma para materiais à base de PEEK e outra para materiais à base de PEAD.

- No terceiro dia procedeu-se à colocação dos extratos nas células e dos meios de cultura nos controlos: os extratos foram colocados nos poços onde foi realizada (no dia anterior) a sementeira de células, sendo depois o conjunto (células + extratos) colocados em incubação por um período de tempo que, de acordo com a norma ISO 10993-5, deve ser no mínimo 24 horas. Neste trabalho utilizou-se um período de 48 horas. Antes da colocação dos extratos nos poços de sementeira, foi necessário aspirar o meio de cultura presente nos mesmos. Posteriormente, pipetaram-se 200 µL do extrato para cada um dos poços das microplacas de interesse. Neste ensaio foram utilizados três tipos de controlo: controlo positivo (citotóxico), controlo negativo (não citotóxico) e controlo de meio. O controlo positivo consistiu em células cultivadas em meio de cultura DMEM completo ao qual foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%. O controlo negativo consiste em células cultivadas em meio DMEM completo. Em ambos o controlo mencionado foi utilizado um volume final de 200 µL por poço. O controlo do meio é efetuado em poços sem células e colocam-se 200 µL de meio (DMEM) em cada poço.

- No quinto dia determinou-se através do teste de resazurina a viabilidade das células. Em comparação com outros métodos de determinação da viabilidade celular este teste tem a vantagem de ser pouco citotóxico. A resazurina é um corante azul não fluorescente que pode ser usado como indicador de pH e como indicador de viabilidade celular. A resazurina é reduzida a um composto cor de rosa fluorescente chamado resorufina, pelas células metabolicamente ativas [57]. A alteração da cor do meio pode ser posteriormente determinada por medição da variação da absorvância, variação esta que é proporcional ao número de células viáveis. Para realizar o teste de viabilidade celular os meios utilizados nos passos anteriores foram aspirados sendo colocada a solução de resazurina: 50% de meio de cultura DMEM completo e 50% de uma solução a 0,04 mg/mL de resazurina em PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Posteriormente colocou-se em incubação em condições *standard* (numa atmosfera de 5% CO₂, 37°), por duas horas, sendo depois lidas as respetivas absorvâncias [58].

Na tabela 3.7 encontra-se, resumidamente, um calendário típico de um teste de citotoxicidade realizado para os materiais em estudo.

Tabela 3.7- Calendário do teste de citotoxicidade.

Dia	Ação
1 (2 ^a f)	Preparação dos extratos
2 (3 ^a f)	Sementeira das células
3 (4 ^a f)	Colocação dos extratos nas células e dos meios nos controlos
5 (6 ^a f)	Teste de resazurina para avaliação da viabilidade das células

4 Análise de resultados

Este capítulo tem como objetivo analisar todos os resultados obtidos durante a realização deste trabalho, de modo a avaliar se os biomateriais desenvolvidos reúnem propriedades adequadas para aplicação em próteses ortopédicas.

4.1 Medidas do ângulo de contato

4.1.1 Descarga de barreira dielétrica

De forma a analisar o efeito da funcionalização por descarga de barreira dielétrica no PEEK e no PEAD, comparou-se a média dos ângulos de contato desses polímeros antes de serem funcionalizados por descarga de barreira dielétrica, com os seus ângulos depois da funcionalização.

As medidas dos ângulos de contato para o PEEK e o PEAD nas suas formas naturais foram efetuadas recorrendo a cinco filmes de PEEK e de PEAD e em cada filme utilizou-se um conjunto de 5 gotas de água, efetuando posteriormente a média, o que permitiu obter um resultado mais confiável. Os ângulos de contato obtidos para o PEEK e para o PEAD nas suas formas naturais estão representados na tabela 4.1.

Tabela 4.1- Média dos ângulos de contato do PEEK e do PEAD.

PEEK	PEAD
$56,5^\circ \pm 0,5^\circ$	$51,4^\circ \pm 0,5^\circ$

Após esses polímeros serem funcionalizados mediu-se novamente os seus ângulos de contato, aplicando os mesmos princípios da primeira medição. Para o PEEK, o ângulo de contato medido após a funcionalização de 10 minutos em comparação com o ângulo obtido sem funcionalização foi muito menor, isto é, a superfície do polímero ficou ainda mais hidrofílica. O mesmo aconteceu para os tempos de funcionalização de 30 e 60 minutos. Porém no de 60 minutos com uma menor amplitude, pois algumas gotas espalharam-se completamente dificultando a leitura do ângulo e outras apresentavam ângulos ligeiramente maiores, mas em média os ângulos de contato diminuíram. De acordo, com literatura a exposição de superfícies poliméricas a DBD pode não conduzir a uma erosão significativa da superfície e o efeito de maior hidroflicidade observado, pode resultar de acumulação de cargas, formação de fragmentos e grupos hidrofílicos oxigenados na superfície. Por outro lado, também está reportado que a hidroflicidade alcançada após exposição ao plasma pode ser de curta duração e

os polímeros voltarem ao seu estado inicial devido ao efeito de restauração hidrofóbica, por alteração nos fatores anteriormente mencionados [16].

Assim, tendo-se verificado que a funcionalização provocava uma diminuição do ângulo de contato era importante verificar se essa diminuição era temporária ou permanente para assim poder-se comparar os resultados obtidos nos polímeros funcionalizados por descarga de barreira dielétrica e revestidos com filmes de TiO_2 com os polímeros apenas revestidos com filmes de TiO_2 .

A avaliação dos ângulos de contato ao longo do tempo, foi efetuada em três períodos, 48 horas, uma semana e duas semanas depois da funcionalização. Os ângulos de contato foram aumentando com o passar o tempo, até atingir um valor muito aproximado do valor obtido sem funcionalização, esse resultado permitiu concluir que a diminuição do ângulo através da funcionalização de barreira dielétrica no PEEK, é um processo recuperável. Com este resultado optou-se por não realizar o estudo comparativo mencionado anteriormente, pois o que se pretendia era analisar o efeito do ângulo de contato, mas como os polímeros conseguiam recuperar o seu estado inicial após serem funcionalizados, não haveria ganho em recorrer a este processo nas condições mencionadas antes de serem revestidos com filmes de TiO_2 . No gráfico 4.1 estão representadas as variações dos ângulos de contato ao longo do tempo, onde 10, 30 e 60 minutos são os tempos de funcionalização utilizados, e 1h, 48h, uma semana e duas semanas são os tempos depois da funcionalização utilizados para medição dos ângulos de contato.

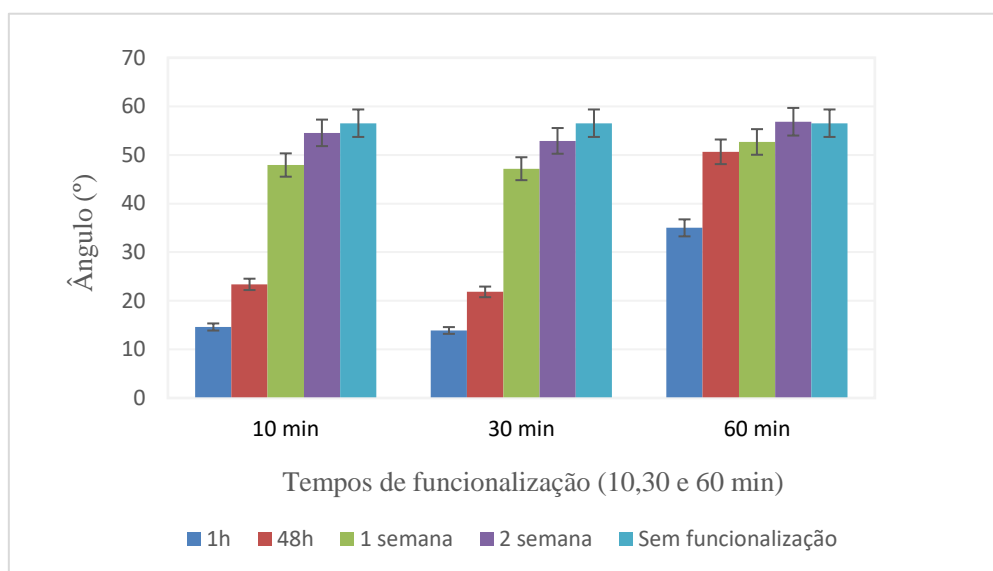


Gráfico 4.1- Variação do Ângulo de contato em função do tempo dos filmes de TiO_2 em PEEK e comparação com o ângulo sem funcionalização.

Os tempos de funcionalização no PEAD foram de 30 e 60 minutos, e os seus ângulos de contacto após terem sido funcionalizados apresentaram um comportamento um pouco

diferente dos observados no PEEK. No PEEK apesar do processo ser recuperável, era drástica a diminuição do ângulo, já no PEAD apesar de existir ainda uma diminuição de ângulo, essa diminuição é bastante menor e também é recuperável, o que permitiu chegar à mesma conclusão do PEEK, isto é, que como a diminuição dos ângulos de contacto era recuperável, pelo que decidiu-se face a estes resultados não fazer mais ensaios de descarga de barreira dielétrica. No gráfico 4.2 estão representadas as variações dos ângulos de contacto para os tempos de funcionalização utilizados e a respetiva comparação com o ângulo antes da funcionalização.

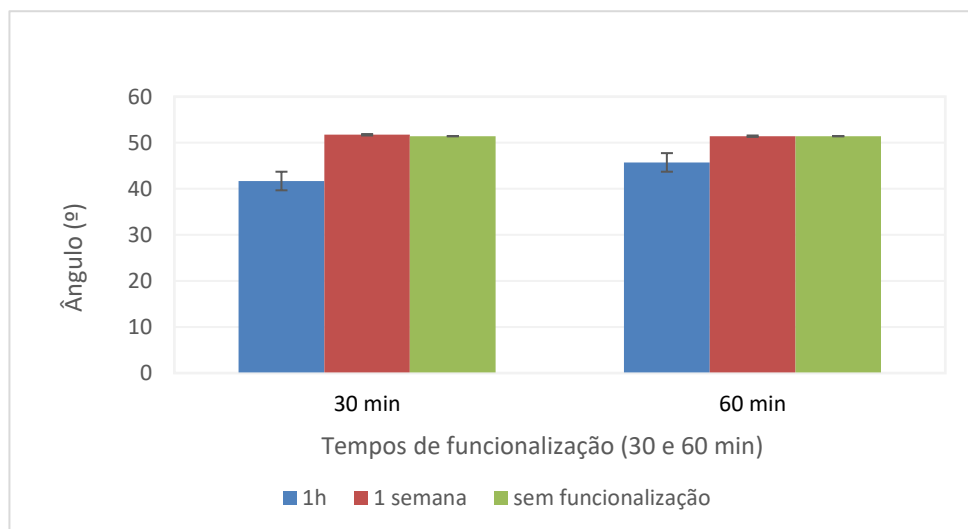


Gráfico 4.2- Variação do ângulo de contato em função do tempo dos filmes de TiO_2 em PEAD e comparação com o ângulo sem funcionalização.

4.1.2 Pulverização catódica

Depois do PEEK e do PEAD serem revestidos por filmes de TiO_2 através da pulverização catódica, mediram-se os seus ângulos de contacto. Para o PEEK, os ângulos de contacto medidos para os filmes produzidos a uma potência de 1000W e para 25, 50 e 75 % de oxigénio os ângulos de contato eram inferiores ao do PEEK sem tratamento, já para os 100% de oxigénio, o PEEK sem tratamento possui um menor ângulo de contacto. Para 1000W, o menor ângulo de contato ocorre para os 25% O_2 . Quando é aplicada uma potência de 1500W, no revestimento com filmes de TiO_2 , os ângulos de contato são muito inferiores ao ângulo do PEEK sem tratamento, independentemente da percentagem de oxigénio utilizada, porém para 75 e 100% O_2 , os ângulos são ainda mais pequenos. Esses resultados podem sugerir que para haver uma mudança significativa no ângulo de contato do filme de TiO_2 em PEEK se deve utilizar uma potência mais elevada, ou uma potência mais baixa a uma menor percentagem de oxigénio.

No gráfico 4.3 estão representadas a variação do ângulo de contacto dos filmes de TiO_2 em PEEK quando é variada a potência e a percentagem de oxigénio e a comparação com o ângulo

do PEEK sem tratamento. Através da análise deste gráfico facilmente pode-se chegar às conclusões mencionadas anteriormente.

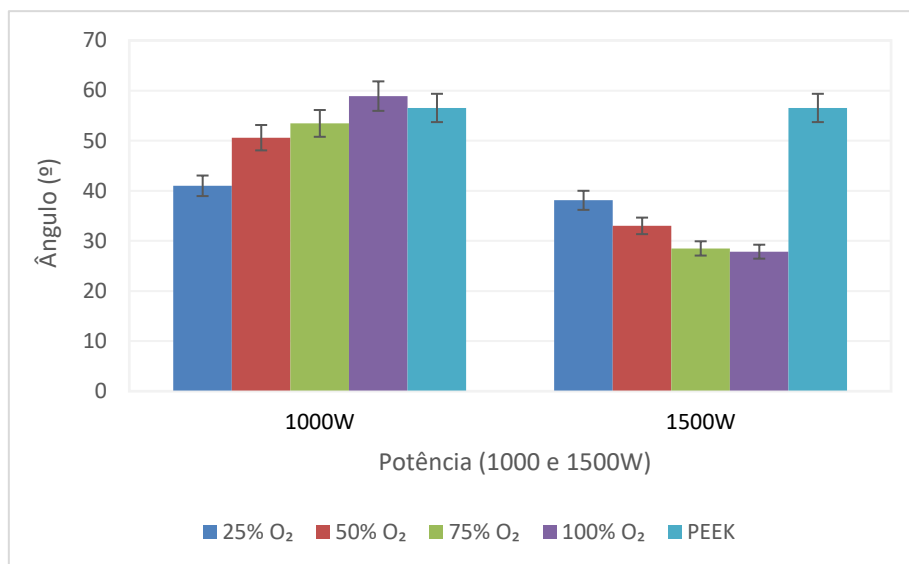


Gráfico 4.3- Variação do ângulo de contato dos filmes de TiO₂ em PEEK em função da potência e percentagem de oxigênio.

Na análise dos ângulos de contacto dos filmes de TiO₂ em PEAD reparou-se que para uma potência de 500W, o ângulo de contacto é sempre superior ao ângulo do PEAD sem tratamento, seja qual for a percentagem de oxigênio. O menor ângulo para a potência de 500W ocorre para os 25% O₂. Para 1000W, quando se tem 75 e 100% de oxigênio, o ângulo de contacto é muito próximo do ângulo de contacto do PEAD sem tratamento. O aumento da percentagem de oxigênio para 1000W leva a uma diminuição do ângulo de contato, sendo por isso o maior ângulo de contacto observado para os 25% de oxigênio. Para os filmes de TiO₂ em PEAD, os valores adotados para a variação da potência aplicada e das percentagens de oxigênio utilizadas não foram suficientes para diminuir o ângulo de contacto em relação ao PEAD sem tratamento, essas variações apenas permitiram o aumento do ângulo de contacto. Essas constatações podem ser observadas no gráfico 4.4.

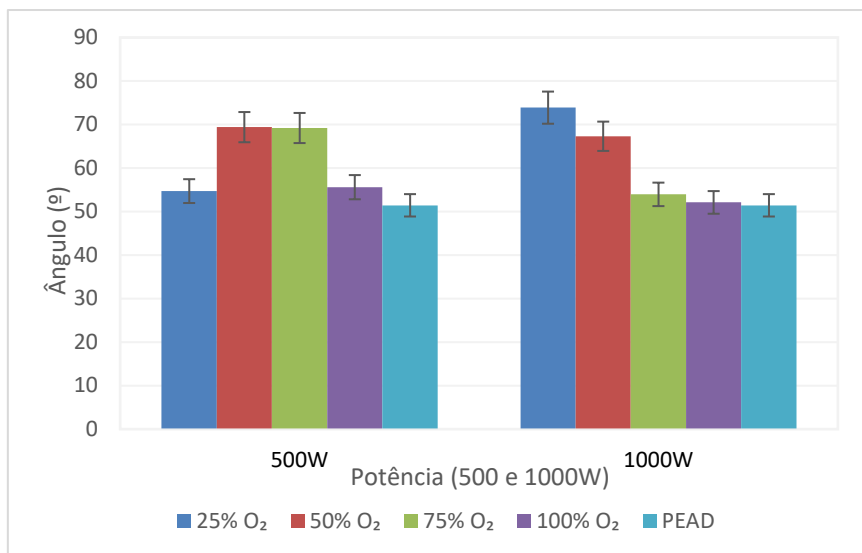


Gráfico 4.4- Variação do ângulo de contato dos filmes de TiO₂ em PEAD em função da potência e percentagem de oxigênio.

A medição dos ângulos de contacto após o revestimento com filmes de TiO₂ revelou que em algumas situações provoca uma mudança drástica no ângulo de contato quando comparada com o ângulo dos materiais sem tratamento, porém essas mudanças não acontecem sempre e nem sempre apresentam evoluções lineares. As alterações dos ângulos de contacto só por si não dizem muito, é necessário comparar essas flutuações com outros tipos de análises, sendo este um dos pontos que será abordado mais à frente.

4.2 Difração de raios-X

De forma a caracterizar do ponto de estrutura os filmes de TiO₂ utilizou-se a técnica de difração de raios-X. Primeiramente, analisaram-se os filmes de PEEK e PEAD, sem qualquer revestimento. Ao observar os difratogramas do PEEK e do PEAD apresentados nos gráficos 4.5 e 4.6, respetivamente, verifica-se que ambos os polímeros apresentam cristalinidade significativa. O difratograma do PEEK, no gráfico 4.5, apresenta três picos de elevada intensidade pertencentes aos planos de difração (110), (113) e (200), para valores de 2θ de 18,8°, 21° e 22,6°, respetivamente e um outro pico de menor intensidade pertencente ao plano (213), por volta de 28, 7°. O difratograma do PEAD, gráfico 4.6, apresenta 2 picos de difração em torno de $2\theta = 21,6^\circ$ e $23,8^\circ$, correspondentes ao plano cristalinos (110) e (200) do PE.

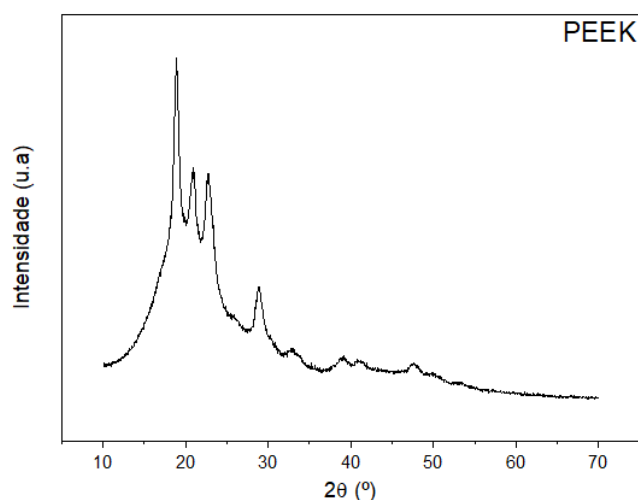


Gráfico 4.5- Difractograma de raios-X obtido para o PEEK sem tratamento.

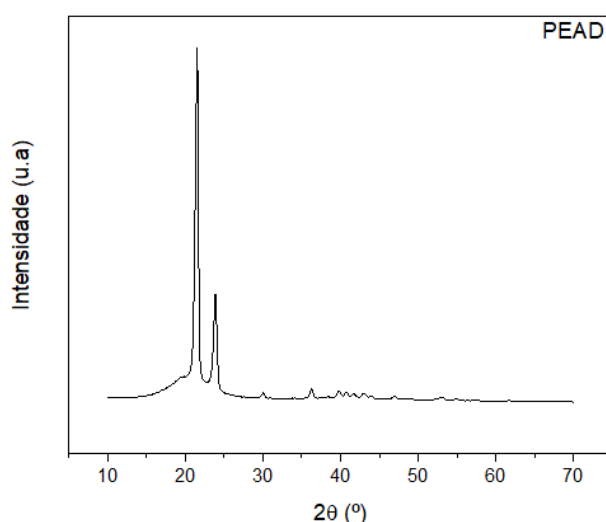


Gráfico 4.6- Difractograma de raios-X obtido para o PEAD sem tratamento.

Dada a elevada cristalinidade, dos filmes de PEEK e PEAD sem revestimento, não foi possível detetar os filmes de TiO_2 depositados em PEEK e em PEAD. Por este motivo, procedeu-se à obtenção dos difractogramas apenas dos filmes de TiO_2 depositados nos substratos de vidro de forma a avaliar a cristalinidade dos filmes de TiO_2 . De salientar, que os filmes em substrato de vidro foram produzidos nos mesmos ensaios que os filmes de TiO_2 em PEEK e em PEAD, ou seja, em simultâneo, para garantir exatamente as mesmas condições. A caracterização estrutural dos filmes de TiO_2 depositados a 500W, para as diferentes percentagens de oxigénio revela que, todos são amorfos, como se pode ver no gráfico 4.7. Estes resultados estão de acordo com um estudo prévio realizado pelo grupo onde este trabalho foi realizado [59].

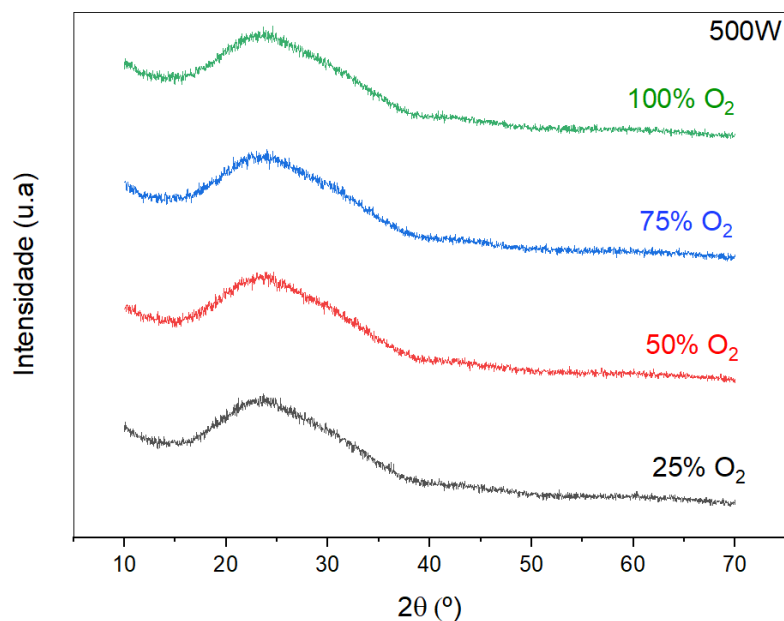


Gráfico 4.7- Difractogramas de raios-X do filme de TiO₂ no substrato de vidro depositado a 500W e com diferentes percentagens de oxigénio.

Quando os filmes são depositados a 1000W, já é possível ver que exibem alguma cristalinidade, sendo os picos de difração observados compatíveis com a estrutura cristalina da fase anatase (ficha ICDD: 0082084 publicada pelo JCPDS-ICDD (Joint Committee on Powder Diffraction Standards, International Centre for Diffraction Data)), como se pode ver pelo gráfico 4.8. Para todas as concentrações de oxigénio são notórios três picos de difração a $2\theta = 25,5^\circ$, $37,9^\circ$, 55° correspondentes aos planos (101), (004) e (105) respetivamente. Para os 75% e 100% de oxigénio observa-se uma melhor definição do pico da fase anatase, correspondente ao plano (105). O aumento da percentagem de oxigénio, a partir dos 50%, provoca uma diminuição da intensidade do pico correspondente ao plano (004).

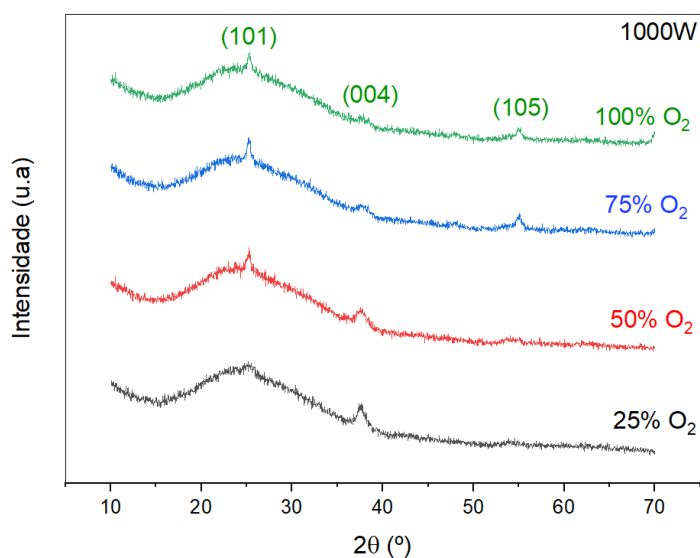


Gráfico 4.8- Difractogramas de raios-X do filme de TiO₂ no substrato de vidro depositado a 1000W e com diferentes percentagens de oxigénio.

Para os 1500W é clara a existência de cristalinidade nos filmes de TiO_2 , como se constata no gráfico 4.9. Com 25% de oxigénio deteta-se novamente o pico da fase anatase, a $2\theta = 25,5^\circ$, o pico a $2\theta = 37,9^\circ$ e o pico a $2\theta = 55^\circ$, correspondentes aos planos (101), (004) e (105), sendo o mais intenso o do plano (004) e o menos intenso corresponde ao plano (105). Quando se utiliza 50% de oxigénio detetam-se dois picos da fase anatase correspondentes aos planos (101) e (004), ambos apresentam pouca intensidade quando comparada com os obtidos a 25% de oxigénio. Para os 75% de oxigénio a intensidade dos picos correspondentes aos planos (101) e (004), diminuem de intensidade quando comparada com os de 25%, já para o pico do plano (105) ocorre um pequeno aumento da intensidade. Quando é utilizada 100% de oxigénio, a intensidade do pico correspondente ao plano (101) atinge um valor muito superior em relação às outras percentagens de oxigénio, o pico do plano (004) é pouco notório e surge um pico de anatase a $2\theta = 47,5^\circ$ correspondente ao plano (200) e observa-se também o pico referente ao plano (105). O aumento da potência permitiu evidenciar ainda mais a cristalinidade dos filmes de TiO_2 , porém para as percentagens, 25% e 100% de oxigénio, a intensidade dos picos são maiores, evidenciando o efeito da percentagem de oxigénio sobre a cristalinidade. É conhecido, que os dois fatores principais que promovem o crescimento cristalino durante o processo de *sputtering* são: a energia térmica induzida por aquecimento do substrato e a energia das partículas “ejetadas” do alvo, incidentes na superfície do substrato. Neste estudo, os substratos não foram intencionalmente aquecidos, mas durante os depósitos dos filmes de TiO_2 , a temperatura do substrato foi monitorizada por um termopar e verificou-se que a temperatura atingiu cerca de 120°C , com o aumento da potência. Desta forma, estes resultados evidenciam que, por um lado a subida na temperatura do substrato que é observada durante as deposições resulta do processo de *sputtering* (impacto das partículas no substrato) e por outro lado, para potências superiores a 500 W (para 500 W a temperatura junto ao substrato não excedeu os 60°C), a temperatura que o substrato atingiu foi suficiente para promover alguma cristalinidade. De salientar também, que a alteração de orientações preferenciais de crescimento que é observada neste estudo, quando é alterada a percentagem de oxigénio já foi observado em alguns estudos referenciados na literatura e também num estudo realizado pelo grupo onde este trabalho foi desenvolvido [59].

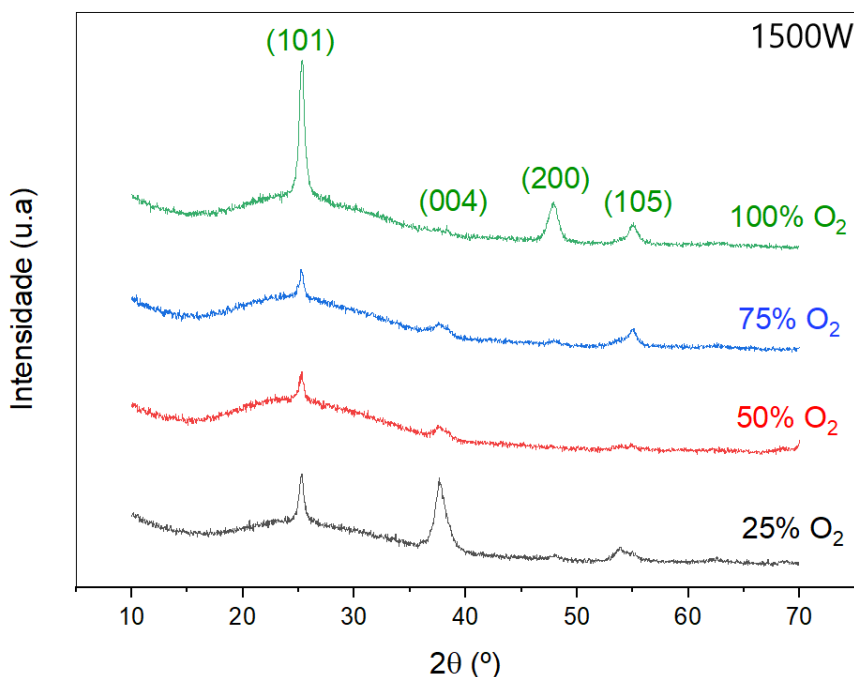


Gráfico 4.9- Difractogramas de raios-X do filme de TiO₂ no substrato de vidro depositado a 1500W e com diferentes percentagens de oxigénio.

O aumento da potência aplicada e da percentagem de oxigénio utilizada durante a deposição dos filmes de TiO₂ aumenta a cristalinidade dos filmes como foi demonstrado pelos difractogramas de raios-X. Para determinada potência e percentagem de oxigénio é possível ver diferentes picos da fase anatase e com diferentes intensidades, comprovando o efeito que a potência e a percentagem de oxigénio exercem sobre as características do filme de TiO₂.

4.3 Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

As imagens obtidas por SEM das amostras do PEEK e do PEAD em comparação com as amostras do PEEK e do PEAD revestidas por filmes de TiO₂ diferem, como era de se esperar, confirmando a presença do filme. Essas imagens permitem analisar a morfologia dos filmes e qual a evolução com a variação da potência e da percentagem de oxigénio durante a deposição de filmes de TiO₂.

Nas figuras 4.1 e 4.2 estão apresentadas as imagens da superfície dos polímeros, PEEK e PEAD sem tratamento, e revestidos por filmes de TiO₂ com diferentes potências e percentagens de oxigénio. É possível verificar que para ambas potências, quando o substrato corresponde ao PEEK, a morfologia varia com o aumento da %O₂ na descarga. Nota-se a presença de aglomerados maiores para os filmes produzidos com 25%O₂, apresentando uma morfologia tipo “couve flor”, que é muito característica deste tipo de filmes de TiO₂. Com o aumento da % de O₂, os aglomerados diminuem de tamanho e evidenciam uma superfície com maior porosidade.

Para os filmes obtidos em PEAD, a morfologia é ligeiramente diferente, porém verifica-se também a presença de aglomerados muito menores e que os tamanhos desses aglomerados diminuem com o aumento da %O₂. Para ambos os polímeros verifica-se que os filmes de TiO₂ são homogêneos e não se observam fissuras que possam evidenciar pouca estabilidade mecânica.

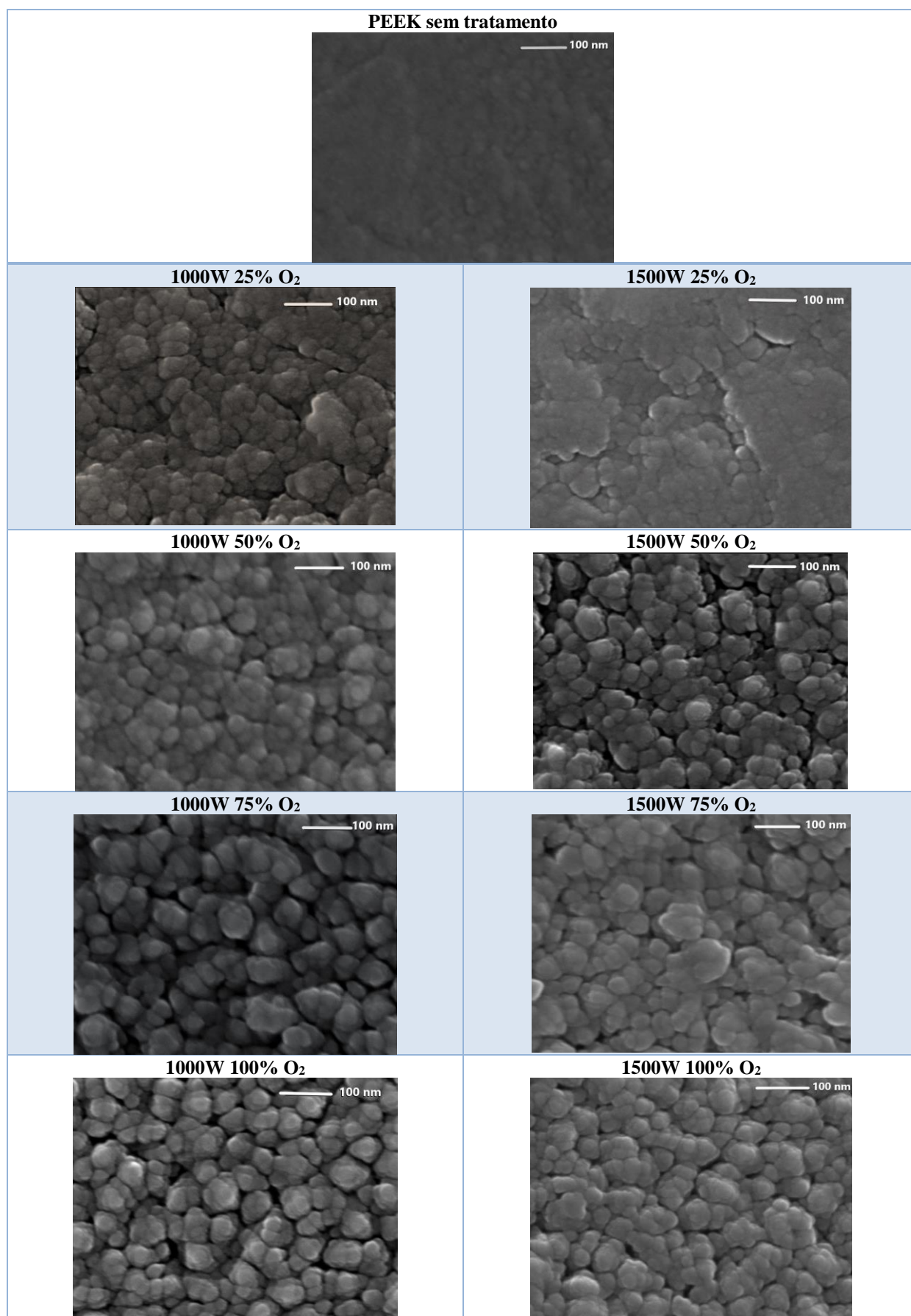


Figura 4.1- Imagens de SEM obtidas para os filmes de TiO₂ em PEEK.

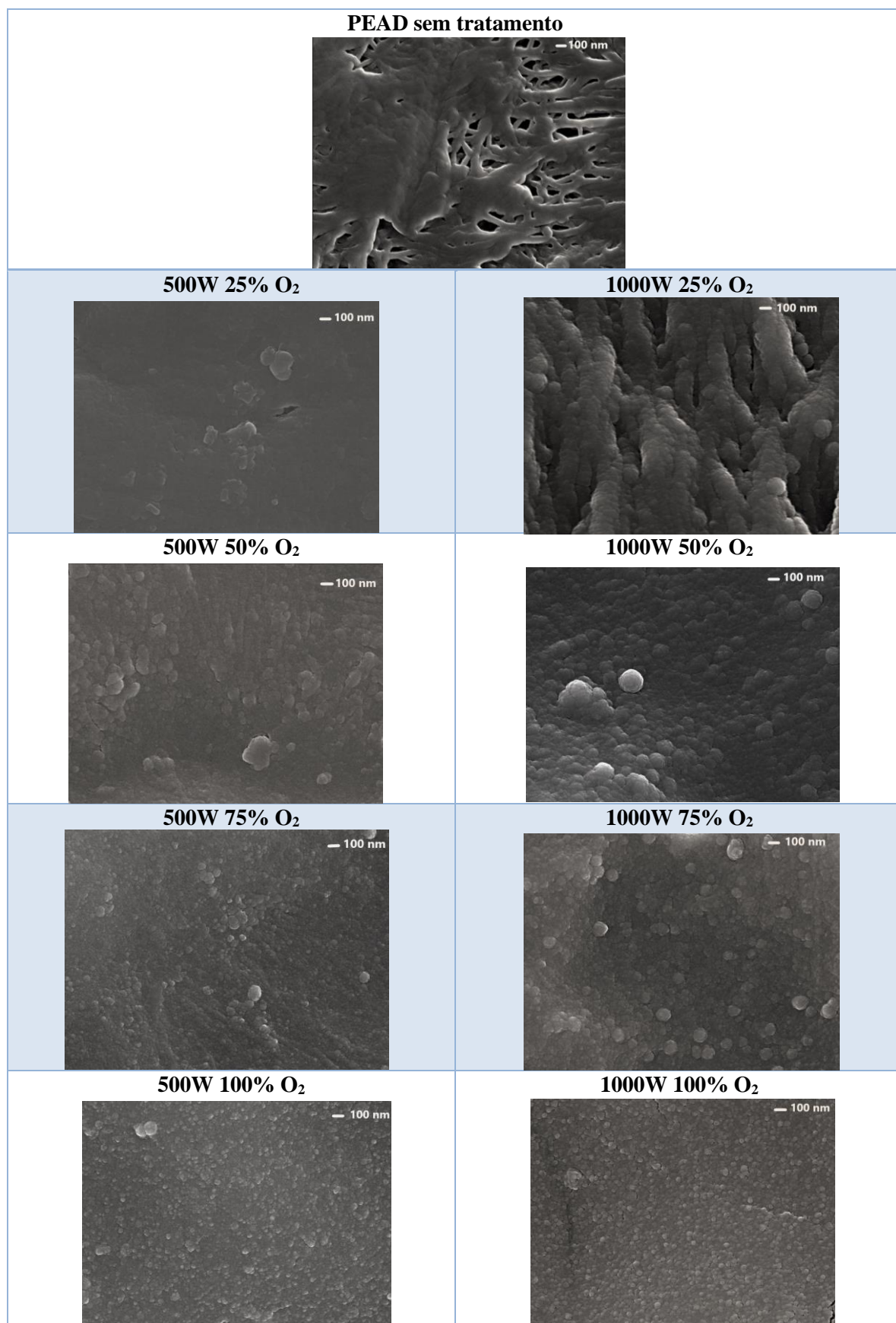


Figura 4.2- Imagens de SEM obtidas para os filmes de TiO₂ em PEAD.

Além das imagens das figuras 4.1 e 4.2 também foram obtidas imagens da secção transversal dos filmes, que permitiram obter a espessura de cada filme de TiO₂. Foi possível também verificar através destas imagens uma boa aderência dos filmes de TiO₂ para ambos os polímeros (ver imagem representativa na figura 4.3), o que revela que os filmes de TiO₂ conferem estabilidade mecânica aos polímeros em estudo, sendo este um dos requisitos para que um biomaterial possa ter aplicação em próteses ortopédicas. Para obter a espessura dos filmes através da imagem da secção transversal é necessário fazer uma correção, essa correção deve-se ao fato da amostra estar posicionada com uma certa inclinação em relação ao eixo de incidência do feixe de elétrons. A espessura medida através da imagem SEM designada espessura observada (d_{obs}) permite obter a espessura SEM (d_{SEM}) do filme aplicando a equação 3.

$$d_{SEM} = \frac{d_{obs}}{\cos 20^\circ} \quad (\text{Equação 3})$$

Na figura 4.3 pode ser observada uma imagem da secção transversal obtida pelo SEM.

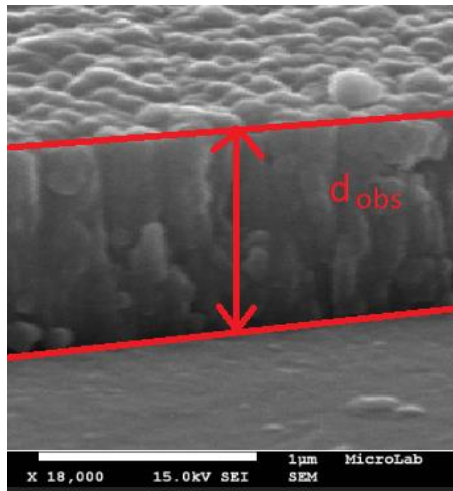


Figura 4.3- Imagem da secção transversal obtida pelo SEM da amostra do PEEK com 50% de oxigênio e 1000W de potência.

A equação 3 pode ser deduzida através da geometria envolvida, apresentada na figura 4.4.

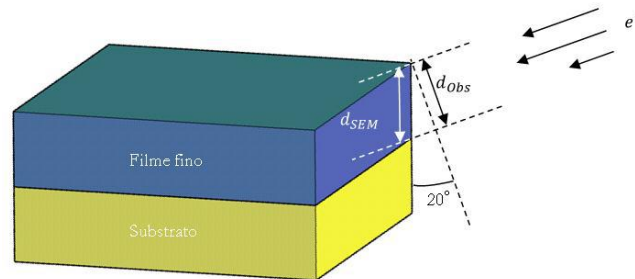


Figura 4.4- Esquema da geometria presente no cálculo da espessura dos filmes finos através das imagens SEM da secção transversal (retirado de [50]).

Os resultados obtidos aplicando a equação 3 a todas as amostras encontram-se nas tabelas 4.2 e 4.3.

Tabela 4.2- Espessura do filme de TiO_2 para as amostras do PEEK.

Potência (W)	O ₂ (%)	Espessura observada (nm)	Espessura SEM (nm)
1000	25	954	1015
1000	50	769	818
1000	75	909	967
1000	100	818	870
1500	25	-	-
1500	50	1333	1419
1500	75	1143	1216
1500	100	1190	1266

Tabela 4.3- Espessura do filme de TiO_2 para as amostras do PEAD

Potência (W)	O ₂ (%)	Espessura observada (nm)	Espessura SEM (nm)
500	25	200	213
500	50	150	160
500	75	125	133
500	100	150	160
1000	25	350	372
1000	50	312,5	333
1000	75	300	319
1000	100	250	266

A espessura do filme de TiO_2 para a amostra do PEEK a 1500W e 25% de oxigénio não foi possível determinar, pois o filme era bastante espesso, como pode ser observada pela figura 4.5.

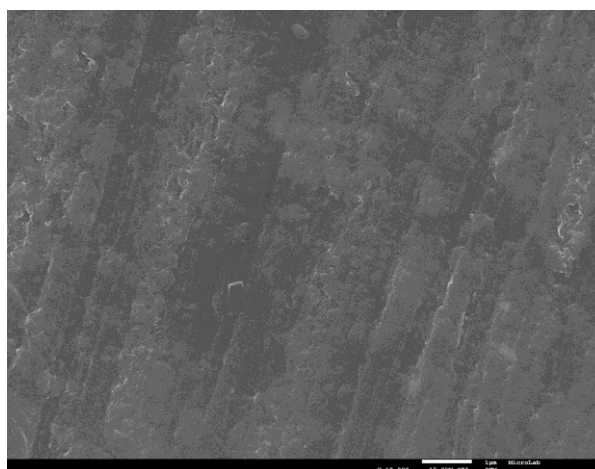


Figura 4.5- Imagem da secção transversal do PEEK a 1500W e 25% de oxigénio.

Após analisar os resultados da tabela 4.2, conclui-se que a maior espessura do filme de TiO_2 do PEEK para os 1000W ocorre com 25% de oxigênio, tendo sido registado a menor espessura para 50% de oxigênio. O segundo máximo para a mesma potência ocorre para os 75% de oxigênio. Para os 1500W, como explicado anteriormente, foi impossível determinar a espessura do filme de TiO_2 para os 25% de oxigênio. Das percentagens onde foi possível medir a espessura do filme, o maior valor é atingido aos 50% de oxigênio, e o menor valor para os 75%. Entre as duas potências o maior valor ocorre para os 25% de oxigênio e 1500W. As espessuras obtidas a 1500W são sempre superiores as espessuras obtidas a 1000W, para as diferentes percentagens de oxigênio utilizadas. Esses resultados mostram que para obter um filme de TiO_2 com maior espessura no PEEK é necessário aplicar uma potência maior e uma menor percentagem de oxigênio, como seria de esperar.

No gráfico 4.10 podem ser observadas as conclusões da análise anterior.

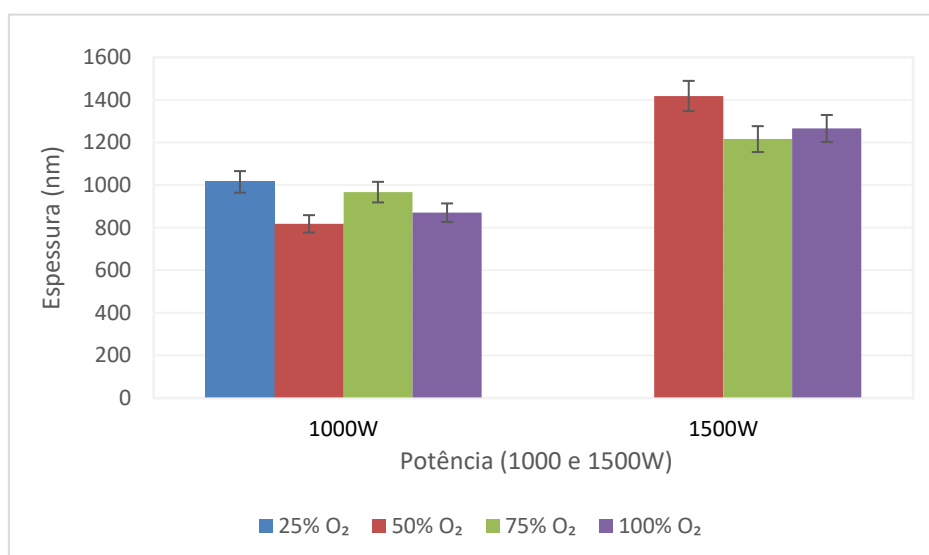


Gráfico 4.10- Espessura do filme de TiO_2 em PEEK depositado com diferentes percentagens de oxigênio e potência.

Da análise da tabela 4.3, verificou-se que as espessuras do filme de TiO_2 em PEAD para os 500W não são muito diferentes uma da outra, porém a maior espessura é para os 25% de oxigênio e a menor para os 75%. Quando a potência é de 1000W a maior espessura volta a ocorrer para os 25% de oxigênio, já o mínimo ocorre para os 100%. É de notar que todas as espessuras de 1000W são superiores às de 500W, qualquer que seja a percentagem de oxigênio. O conhecimento do efeito da potência na espessura do filme permite obter filmes com uma espessura desejada mais facilmente. Além da potência é importante considerar o efeito que as percentagens de oxigênio têm sobre as espessuras dos filmes, pois para potências mais elevadas quanto maior for a percentagem de oxigênio, menor é a espessura do filme em PEAD.

Em forma de resumo, o gráfico 4.11 ilustra as conclusões efetuadas na análise anterior.

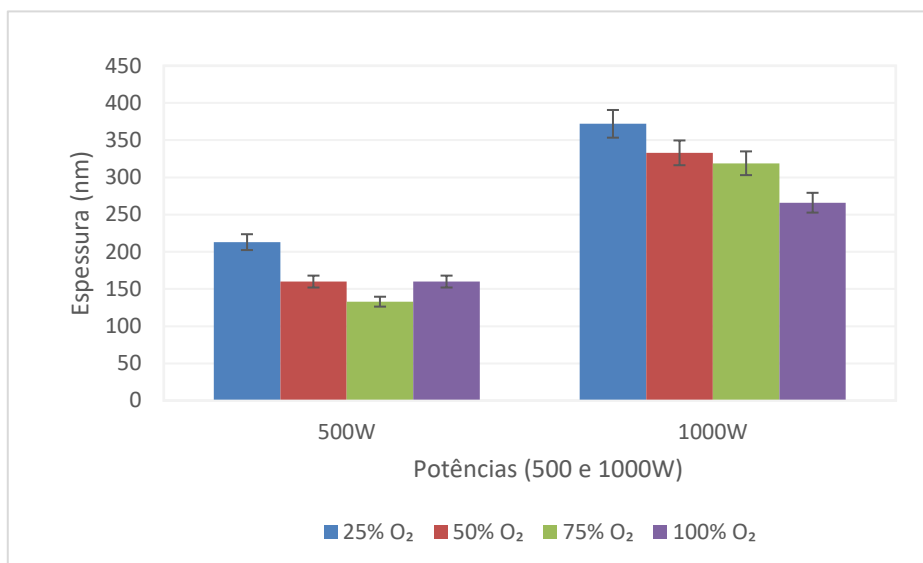


Gráfico 4.11- Espessura do filme de TiO₂ em PEAD depositado com diferentes percentagens de oxigénio e potência.

Depois das análises anteriores verificou-se que tanto para o PEEK como para o PEAD, a maior espessura do filme de TiO₂ é obtida quando é aplicada uma maior potência, conjugada com uma menor percentagem de oxigénio. Com isso conclui-se que para se obter um filme de maior espessura, a potência deve variar inversamente com a percentagem de oxigénio, isto é, para potências maiores deve-se utilizar uma menor percentagem de oxigénio.

Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS)

Após estudar a morfologia e espessura dos filmes de TiO₂, também foi efetuada espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS), para confirmar a presença dos TiO₂ nos filmes produzidos. A EDS é uma técnica analítica utilizada para a análise elementar ou caracterização química de uma amostra.

Essa análise, como era de se esperar, comprovou a existência do titânio e de oxigénio, como se pode observar pelo gráfico 4.12. A presença de Cr, é proveniente do filme de Cr depositado nas amostras para permitir a análise por SEM.

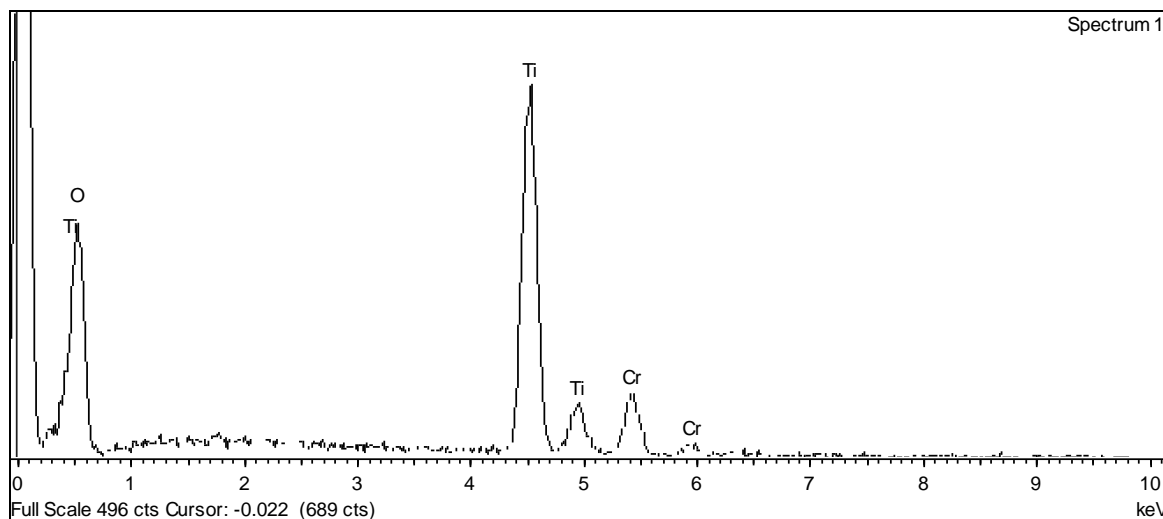


Gráfico 4.12- Espectro EDS da amostra do PEEK produzido a 1000W e com 75% de oxigénio.

4.4 Citotoxicidade

De forma a estudar a biocompatibilidade dos materiais produzidos foram feitos testes de citotoxicidade. Para tal realizaram-se medidas de absorvância para 570 nm e 600 nm, de modo a estudar a viabilidade celular de cada material produzido, isto é, avaliar a biocompatibilidade.

Como os espectros de absorvância de 570 nm e 600 nm se sobrepõem, para obter uma informação quantitativa da conversão de resazurina em resorufina é necessário efetuar dois tipos de correção aos resultados:

1 - Subtrair a absorvância medida a 600 nm, DO_{600} , à absorvância medida a 570 nm, DO_{570} : Subtrai-se todos os poços, quer tenham células quer não tenham (caso do controlo de meio, DO_{CM570} e DO_{CM600}); de modo a fazer uma análise estatística dos resultados, cada medida foi replicada pelo menos 5 vezes; para cada conjunto de réplicas calcula-se a média dos valores de $(DO_{570} - DO_{600})$ e o correspondente desvio padrão experimental, σ . O mesmo acontece para o controlo de meio, calcula-se a média de $(DO_{CM570} - DO_{CM600})$ e o respetivo desvio padrão experimental, σ_{CM} ;

2 – Posteriormente à média obtida no ponto anterior dos poços com células é subtraída o valor médio obtido para o controlo de meio, pelo que resulta que a medida de resazurina convertida em resorufina é descrita pela equação 4:

$$(DO_{570} - DO_{600}) - (DO_{CM570} - DO_{CM600}) \quad (\text{Equação 4})$$

A incerteza associada, Δ , calcula-se por propagação dos desvios padrão através da equação 5:

$$\Delta = \sqrt{\sigma^2 + \sigma_{CM}^2} \quad (\text{Equação 5})$$

Aplicaram-se essas correções tendo-se obtido os valores presentes nas tabelas 4.4 a 4.9.

Tabela 4.4- Resultados obtidos da viabilidade celular para o PEEK normal e para o PEEK com filme de TiO₂ depositado com diferentes percentagens de O₂ e de potência aplicada.

Material no Poço	Média (DO₅₇₀-DO₆₀₀)	Desvio Padrão (σ)	Resorufina	Δ	Viabilidade celular relativa (%)
PEEK	0,37	0,01	0,61	0,01	98,3
50% O ₂ 1000W	0,39	0,03	0,63	0,03	101,8
75% O ₂ 1000W	0,40	0,01	0,63	0,01	102,0
100% O ₂ 1000W	0,39	0,02	0,63	0,02	101,6
25% O ₂ 1000W	0,40	0,02	0,63	0,02	102,0
50% O ₂ 1500W	0,39	0,03	0,63	0,03	101,3
75% O ₂ 1500W	0,35	0,04	0,59	0,04	95,1
100% O ₂ 1500W	0,37	0,03	0,61	0,03	97,5
25% O ₂ 1500W	0,40	0,02	0,64	0,02	102,6

Tabela 4.5- Média e desvio padrão obtidos do controlo do meio para o PEEK.

Material no Poço	Média (DO_{CM570}-DO_{CM600})	Desvio Padrão (σ_{CM})
Controlo do meio	-0,24	0,03

Tabela 4.6- Resultados obtidos para o controlo positivo e o controlo negativo do PEEK.

Material no Poço	Média (DO₅₇₀-DO₆₀₀)	Desvio Padrão (σ)	Resorufina	Viabilidade celular relativa (%)
Controlo +	-0,22	0,002	0,018	2,9
Controlo -	0,38	0,010	0,622	100,0

Tabela 4.7- Resultados obtidos da viabilidade celular para o PEAD normal e para o PEAD com filme de TiO₂ depositado com diferentes percentagens de O₂ e de potência aplicada.

Material no Poço	Média (DO ₅₇₀ -DO ₆₀₀)	Desvio Padrão (σ)	Resorufina	Δ	Viabilidade Celular relativa (%)
25% O ₂ 1000W	0,42	0,03	0,66	0,03	103,5
50% O ₂ 1000W	0,44	0,05	0,68	0,05	106,0
75% O ₂ 1000W	0,42	0,02	0,66	0,02	102,5
100% O ₂ 1000W	0,40	0,02	0,64	0,02	99,1
25% O ₂ 500W	0,41	0,02	0,65	0,02	101,4
50% O ₂ 500W	0,41	0,02	0,65	0,02	100,9
75% O ₂ 500W	0,40	0,04	0,64	0,04	99,5
100% O ₂ 500W	0,37	0,02	0,61	0,02	94,9
PEAD	0,42	0,01	0,66	0,02	102,2

Tabela 4.8- Média e desvio padrão obtidos do controlo do meio para o PEAD.

Material no Poço	Média (DO _{CM570} - DO _{CM600})	Desvio padrão (σ _{CM})
Controlo do meio	-0,24	0,005

Tabela 4.9- Resultados obtidos para o controlo positivo e o controlo negativo do PEAD.

Material no Poço	Média (DO ₅₇₀ -DO ₆₀₀)	Desvio Padrão (σ)	Resorufina	Viabilidade celular relativa (%)
Controlo +	-0,22	0,002	0,019	3,0
Controlo -	0,40	0,013	0,64	100,0

A percentagem da viabilidade celular relativa (viabilidade relativa aos controlos) permite saber se um material é citotóxico ou não. Podendo-se ainda saber se um material é levemente citotóxico, moderadamente citotóxico ou severamente citotóxico. A tabela 4.10 apresenta as percentagens da viabilidade celular e a sua respetiva classificação.

Tabela 4.10- Classificação da citotoxicidade de um material através da percentagem da viabilidade celular relativa.

Citotoxicidade	Viabilidade celular relativa (%)
Não citotóxico	≥ 90
Levemente citotóxico	80 a 89
Moderadamente citotóxico	50 a 79
Severamente citotóxico	< 50

Através da análise da tabela 4.10 e dos resultados obtidos nas tabelas 4.4 e 4.7, pode-se avaliar a citotoxicidade dos diferentes materiais. Começando-se a análise pelos materiais em que o substrato é o PEEK rapidamente se percebe que nenhum deles é citotóxico. Analisando mais em detalhe é notável que para potências mais elevadas (1500W) e percentagem de oxigénio superior a 25%, a viabilidade celular é um pouco inferior quando comparado com as obtidas para os filmes de TiO₂ produzidos a 1000W. Para uma potência de 1500W e percentagens de oxigénio entre 75 e 100%, a percentagem da viabilidade celular é inferior mesmo quando comparada com a percentagem do PEEK sem tratamento. Já para a potência de 1000W, não se nota grandes diferenças quando se varia a percentagem de oxigénio, porém os maiores valores acontecem para percentagens de 25 e 75% de oxigénio. É de notar que a menor percentagem de viabilidade celular ocorre quando se utiliza uma percentagem de 100% de oxigénio, apesar de ser uma pequena diferença (~ 0,4%). A viabilidade celular obtida quando se usam os 1000W quando comparada com a viabilidade celular obtida quando se utiliza o PEEK sem tratamento, é sempre superior, independentemente da percentagem de oxigénio utilizada. O valor máximo de viabilidade celular obtido foi de 102,55% de viabilidade celular relativa tendo-se obtido a uma potência de 1500W e 25% de oxigénio, e o segundo maior foi de 102,04% de viabilidade celular relativa obtido a 1000W e 75% de oxigénio. Esses resultados podem significar que a relação entre a potência a ser aplicada e a percentagem de oxigénio a utilizar variam inversamente, isto é, para potências muito elevadas uma percentagem de oxigénio mais baixa pode ser mais apropriada e vice-versa.

No gráfico 4.13 estão representadas as percentagens da viabilidade celular relativa obtidas para o PEEK sem tratamento e para o PEEK depois de revestido com filmes de TiO₂ às potências de 1000W e 1500W e com diferentes percentagens de oxigénio (25, 50, 75, e 100%). Nos gráficos seguintes é possível verificar as constatações da análise anterior.

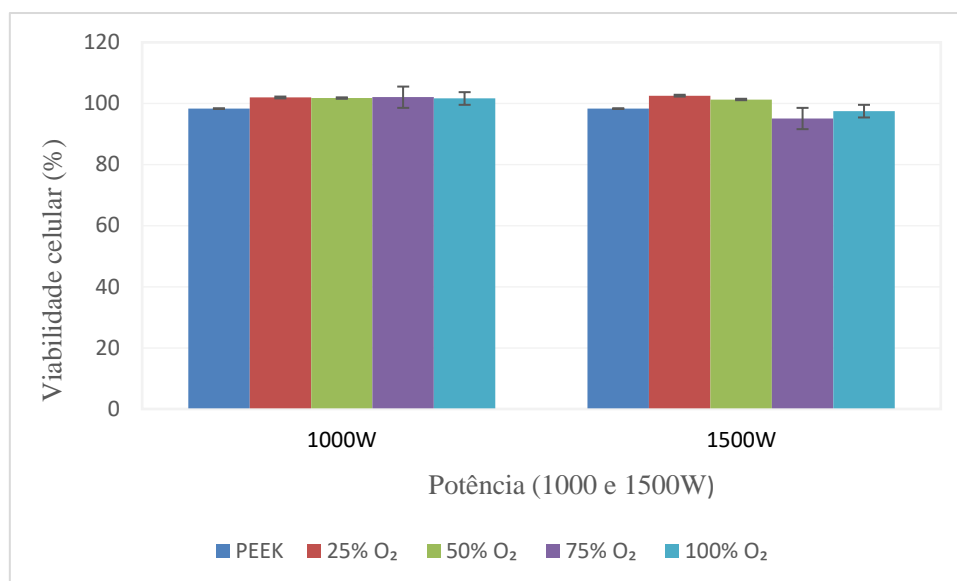


Gráfico 4.13- Viabilidade celular do PEEK sem tratamento e do PEEK com filme de TiO₂ depositado com diferentes percentagens de O₂ e de potência aplicada.

Analisando a tabela 4.7 e 4.10 conclui-se que o PEAD quer sem tratamento ou com tratamento, não é citotóxico. O revestimento do PEAD com filmes de TiO₂ a uma potência de 500W e com diferentes percentagens de oxigénio resulta numa menor viabilidade celular quando comparada com o PEAD sem tratamento, tendo-se também verificado que a viabilidade vai diminuindo à medida que se aumenta a percentagem de oxigénio utilizada. Quando o PEAD é revestido por filmes de TiO₂ a uma potência de 1000W e com diferentes percentagens de oxigénio, a viabilidade celular é maior que do PEAD sem tratamento quando se utiliza 25%, 50% e 75% de oxigénio, ao contrário do que acontece para 100% de O₂ que é inferior à que se obtém quando se usa PEAD sem tratamento. À medida que a percentagem de oxigénio vai aumentando, até aos 50%, a viabilidade celular tende a aumentar, voltando a descer para percentagens de oxigénio superiores a 50%. A viabilidade atinge o seu máximo (106,0%) a uma potência de 1000W e com 50% de oxigénio e o seu mínimo à mesma potência, ocorre quando atinge a percentagem máxima de oxigénio (100%). Esses resultados podem sugerir que para filmes de TiO₂ em PEAD depositados a 500W, não produzem o resultado desejado, e que existe um limite entre a potência a ser aplicada e a percentagem de oxigénio a ser utilizada, sendo nas condições testadas os parâmetros de deposição mais adequados: 1000W de potência e 50% de oxigénio.

No gráfico 4.14 estão representadas as percentagens da viabilidade celular relativa para o PEAD (sem tratamento) e para o PEAD depois de revestido com filmes de TiO₂ às potências de 500W e 1000W e com diferentes percentagens de oxigénio (25%, 50%, 75%, e 100%). Nesse gráfico pode-se constatar a análise anterior.

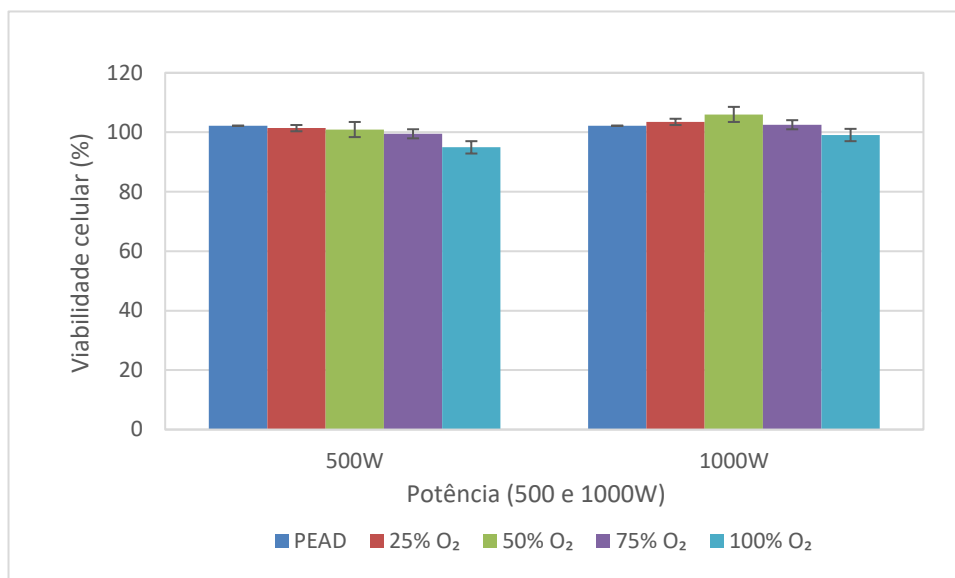


Gráfico 4.14- Viabilidade celular do PEAD sem tratamento e do PEAD com filme de TiO₂ depositado com diferentes percentagens de O₂ e de potência

O teste de citotoxicidade permite concluir que os materiais, PEEK e PEAD nas suas formas naturais, não são citotóxicos, como era de se esperar, porém quando revestidos com filmes de TiO₂, a determinada potência e percentagem de oxigénio, apresentam uma viabilidade ainda maior. É de notar que para determinadas potências e percentagens de oxigénio a viabilidade celular pode ser menor, quando comparada com materiais sem tratamento, sendo por isso muito importante saber qual a relação entre a potência e a percentagem de oxigénio necessária para se obter um filme com uma melhor viabilidade celular. Esses resultados confirmam a tese que o revestimento de polímeros com filmes de TiO₂ aumenta a biocompatibilidade do material.

4.5 Teste de adesão das células e marcação com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)

Depois do teste de citotoxicidade, foram selecionadas as cinco amostras que apresentaram melhor viabilidade celular, sendo duas do PEAD e três do PEEK, para realizar o teste de adesão. Além dessas 5 amostras, as amostras do PEEK e do PEAD sem revestimento também foram incluídas neste teste. Relativamente às duas amostras selecionadas de TiO₂ em PEAD, uma foi produzida com 25% de O₂ a 500W e outra com 50% de O₂ a 1000W. As amostras de TiO₂ em PEEK, foram produzidas com 25% e 75% de O₂ a 1000W e 25% de O₂ a 1500W.

Para o teste de adesão, foi realizada uma sementeira com duração de 7 dias; para esta sementeira utilizou-se a razão 30 k células/ cm² e o meio utilizado foi o *McCoy's 5A* (anexo 1). Vinte e quatro horas depois da sementeira foi medida a absorvância, que permitiu estimar a adesão das células às amostras; a cada dois dias foram efetuadas novas leituras de absorvâncias, o que

permitiu fazer uma estimativa da proliferação celular. As leituras de absorvância foram efetuadas em placas de 96 poços (figura 4.6).

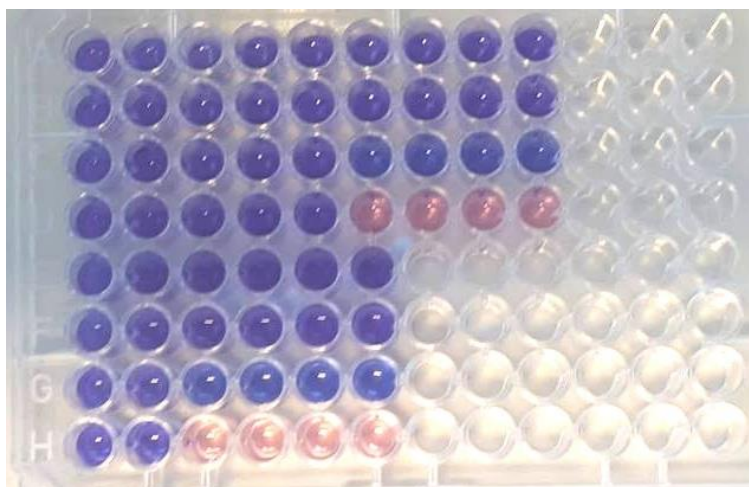


Figura 4.6- Placa com as culturas efetuadas para a leitura da absorvância.

O teste de adesão permite verificar a adesão das células aos biomateriais produzidos, no entanto para que os resultados sejam fidedignos é necessário um estudo estatístico alargado, por isso as culturas foram repetidas várias vezes.

Os resultados obtidos indicam que a melhor taxa de adesão é obtida pelo filme de TiO_2 em PEAD produzidos com 50% de O_2 e 1000W e para o filme de TiO_2 em PEEK depositado a 25% de O_2 e 1500W. As amostras do PEEK e do PEAD sem revestimento, apresentam menor adesão, sendo as amostras de PEAD as que apresentam a menor taxa de adesão de todas as amostras estudadas.

Como seria de esperar, com o passar dos dias, as células proliferaram e no geral os filmes de TiO_2 em PEEK depositados com 25% de O_2 a 1000W e os filmes TiO_2 em PEAD depositados com 50% de O_2 a 1000W, apresentam melhor taxa de proliferação

A partir do gráfico 4.15 é possível observar as conclusões anteriores.

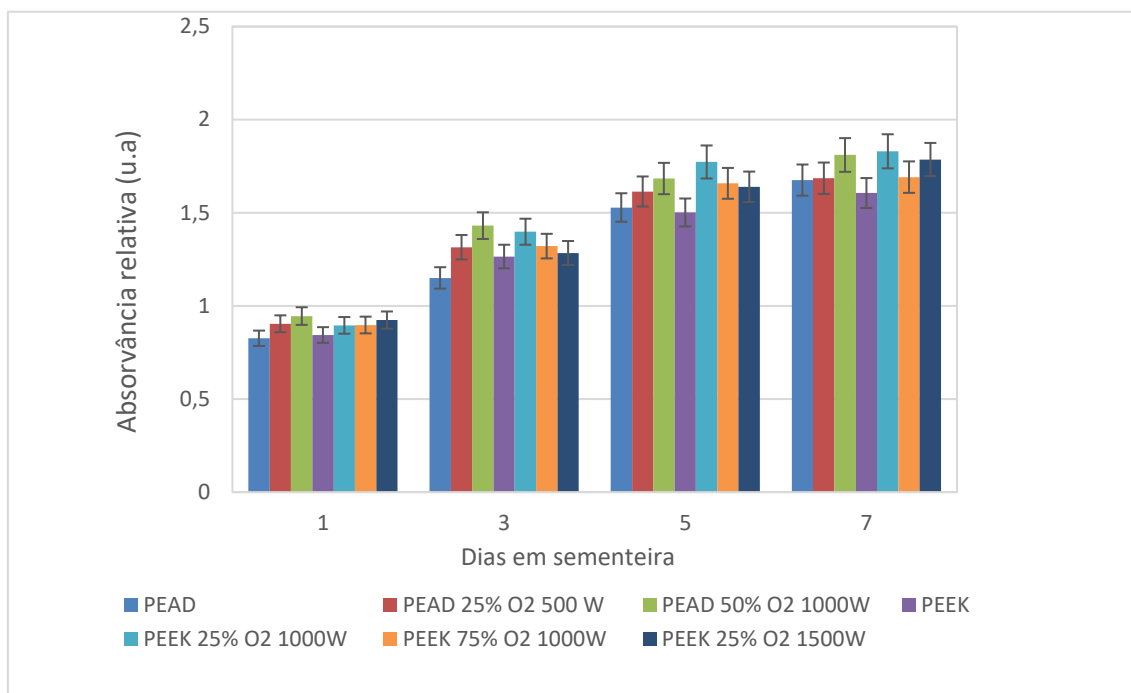


Gráfico 4.15- Taxa de adesão e de proliferação de células nas amostras do PEEK e do PEAD com TiO₂.

Aos dados da adesão foi aplicado o teste *t-student* que confirmou que o revestimento do PEEK e do PEAD com filmes de TiO₂ permitiu uma melhoria na capacidade de adesão das células a esses polímeros, pois na maioria dos filmes testados os valores da adesão celular quando comparados com os valores obtidos para o PEEK e para o PEAD sem tratamento, segundo o teste *t-student* revelaram diferenças estatisticamente significativas. Desta forma, é possível concluir que para se obter uma taxa de adesão superior deve-se revestir os polímeros com filmes de TiO₂, depositados nas seguintes condições: 50% de O₂ a 1000W e 25% de O₂ a 1500W, para PEAD e PEEK, respetivamente.

Na tabela 4.11 encontra-se os valores da adesão, os valores do *p-value* obtido pela aplicação do teste *t-student* e a significância do mesmo. O nível de significância utilizado para o teste foi $p = 0,05$. Caso $p > 0,05$ a diferença não é significativa (N), caso $p < 0,05$ a diferença é significativa (S).

Tabela 4.11- Valores da adesão e do teste t-student obtidos para os filmes do PEEK e do PEAD com e sem revestimento de filmes de TiO₂.

	Adesão (%)	PEAD-50% O ₂ 1000W	PEAD-25% O ₂ 500W	PEEK-75% O ₂ 1000W	PEEK-25% O ₂ 1000W	PEEK-25% O ₂ 1500W	PEAD	PEEK
PEAD-50% O ₂ 1000W	95 ± 5	–	0,15	0,11	0,1	0,54	<0,0001	<0,0001
PEAD-25% O ₂ 500W	90 ± 9	N	–	0,83	0,79	0,46	0,015	0,032
PEEK-75% O ₂ 1000W	90 ± 9	N	N	–	0,95	0,36	0,03	0,068
PEEK-25% O ₂ 1000W	90 ± 9	N	N	N	–	0,33	0,037	0,079
PEEK-25% O ₂ 1500W	92 ± 8	N	N	N	N	–	0,0018	0,0036
PEAD	83 ± 8	S	S	S	S	S	–	0,42
PEEK	84 ± 4	S	S	N	N	S	N	–

Os resultados obtidos indicam que o revestimento dos polímeros PEEK e PEAD com filmes de TiO₂ aumentam a taxa de adesão das células a esses biomateriais, podendo assim ser a solução para um dos maiores problemas dos polímeros quando aplicados em ortopedia.

Marcação com DAPI

Além de estudar a adesão das células e a sua respetiva proliferação, as amostras foram marcadas com DAPI para ver a morfologia dos núcleos das células, após 5 dias de cultura. Fez-se a marcação apenas no canal azul pois o PEEK possui muita fluorescência no canal verde e vermelho, como pode ser observado nas figuras 4.7 e 4.8.

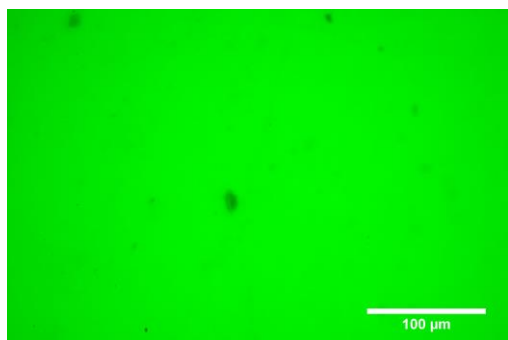


Figura 4.7- Fluorescência do PEEK no canal verde.

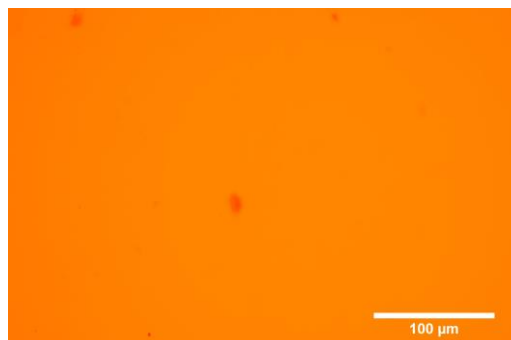


Figura 4.8- Fluorescência do PEEK no canal vermelho.

As imagens das figuras 4.9 e 4.10 (PEEK e PEAD, respectivamente) obtidas da marcação com DAPI mostram que as células aderiram nas amostras, pois a morfologia dos núcleos encontra-se no estado adequado.

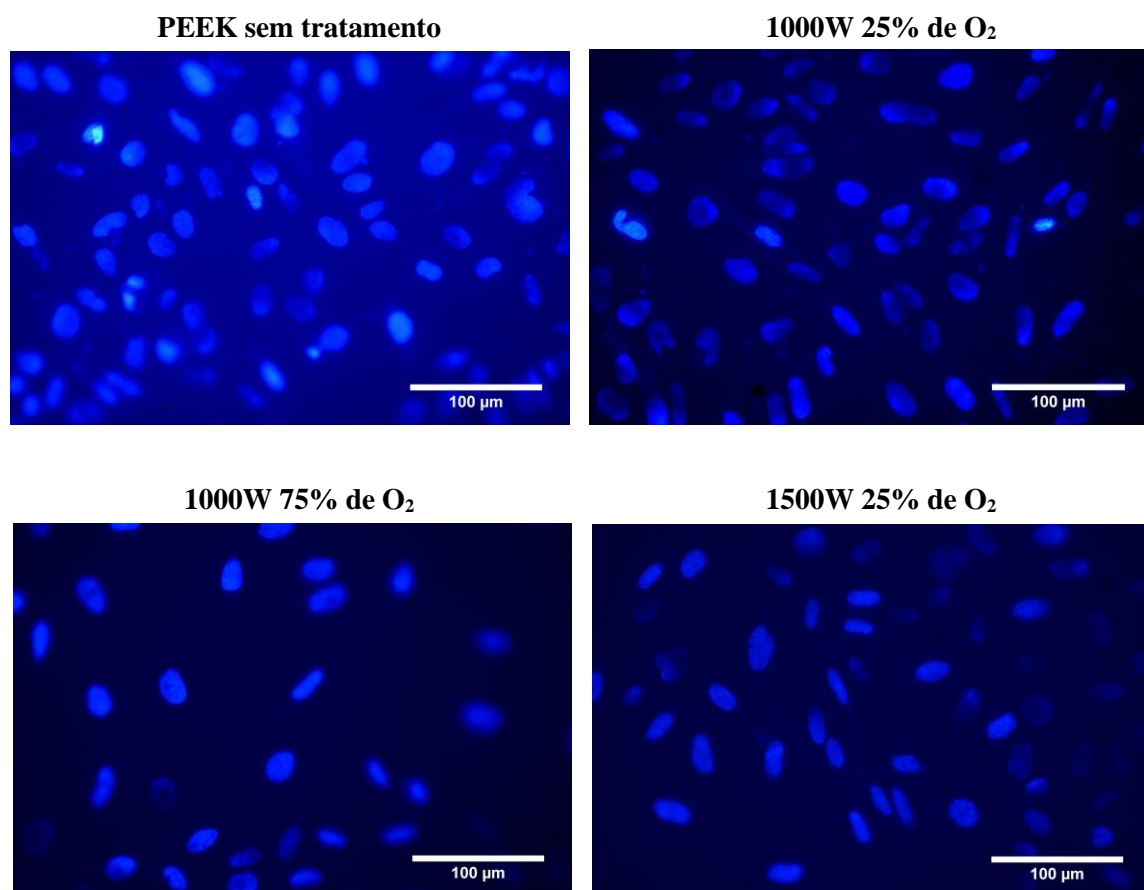
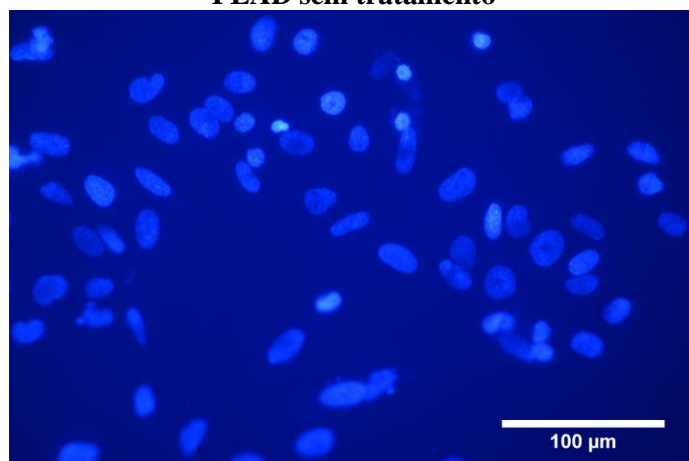
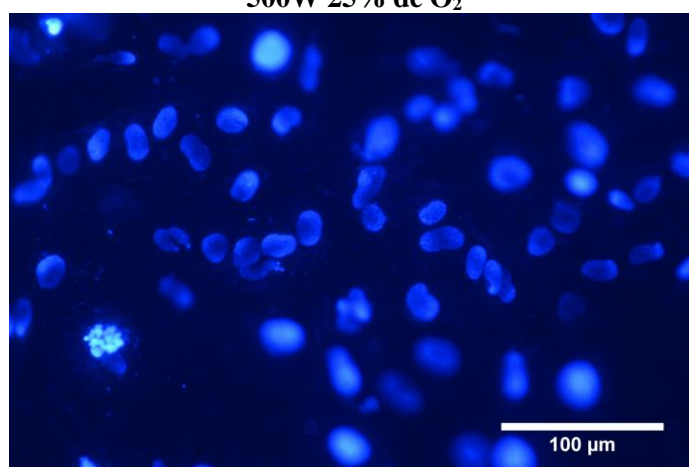


Figura 4.9- Imagens dos núcleos das células obtidas para os filmes de TiO_2 em PEEK.

PEAD sem tratamento



500W 25% de O₂



1000W 50% de O₂

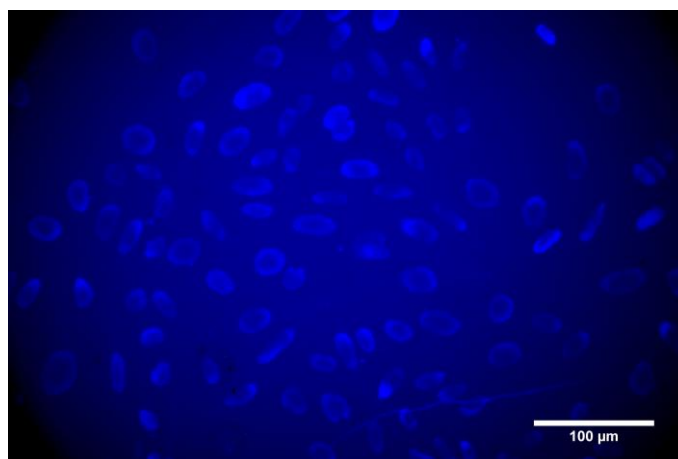


Figura 4.10- Imagens dos núcleos das células obtidas para os filmes de TiO₂ em PEAD. As imagens das figuras 4.9 e 4.10 reforçam a conclusão obtida no teste de adesão, isto é, a capacidade de adesão das células de osteoblastos a esses biomateriais.

5 Conclusões e trabalho futuro

Neste capítulo são apresentadas as principais conclusões e algum trabalho futuro que seria importante realizar para complementar o estudo realizado nesta dissertação.

5.1 Conclusões

O objetivo deste trabalho consistiu em obter biomateriais adequados para aplicação em ortopedia, para tal alterou-se as propriedades dos polímeros, PEEK e PEAD, através de tecnologias de plasma, nomeadamente descarga de barreira dielétrica e pulverização catódica. Para validar a tese que o tratamento efetuado realmente iria permitir obter biomateriais apropriados para ortopedia foram efetuados vários testes de caracterização.

A primeira tecnologia de plasma a ser utilizada neste trabalho foi a descarga de barreira dielétrica, que tinha como função alterar as propriedades superficiais, nomeadamente rugosidade, do PEEK e do PEAD. Antes de se aplicar esta técnica, mediram-se os ângulos de contacto para posteriormente comparar com os ângulos obtidos depois da aplicação da descarga de barreira dielétrica. Porém, concluiu-se que este processo e as condições testadas não permitiu uma alteração permanente das suas propriedades superficiais, o que para este trabalho era crucial, descartando assim a hipótese do uso desta técnica, seguindo-se então a utilização da técnica de pulverização catódica.

A pulverização catódica permitiu a deposição de filmes, neste caso TiO_2 , com diferentes parâmetros de deposição, como pressão do gás, potência, percentagem de oxigénio, tempo de deposição. Efetuou-se a deposição com pressão de trabalho e tempo constante, variando a potência aplicada e as percentagens de oxigénio. Após a deposição dos filmes de TiO_2 mediram-se os ângulos de contacto verificando-se que determinadas condições alteraram drasticamente os ângulos de contacto.

A microscopia eletrónica de varrimento revelou que para o PEEK a maior espessura do filme de TiO_2 é obtida quando os parâmetros de deposição são: 1500W e 50% de oxigénio. Para os 1000W obteve-se a maior espessura a 25% de oxigénio. Para o PEAD a maior espessura é obtida a 1000W e 25% de oxigénio e para ambas as potências de 500W e 1000W, obtiveram-se as espessuras maiores para 25% de oxigénio.

A difração de raios-X permitiu concluir que as percentagens de oxigénio utilizadas bem com as potências têm efeito sobre a cristalinidade do filme. Para potências maiores é possível observar mais picos de difracção correspondentes à fase anatase e com maiores intensidades, o que

resulta do aumento da temperatura do substrato como consequência do processo de *sputtering* (impacto das partículas no substrato), que é suficiente para promover alguma cristalinidade. A percentagem de oxigénio também influencia a orientação preferencial de determinados picos da fase anatase, tendo sido registado o maior pico correspondente ao plano (101) para 1500W e 100% de oxigénio. O pico correspondente ao plano (004) apresenta maior intensidade para o filme de TiO₂ produzido a 1500W e 25% de oxigénio.

Além das técnicas de caracterização utilizadas para os filmes de TiO₂ também foram efetuados testes de citotoxicidade para avaliar a biocompatibilidade dos biomateriais produzidos e testes de adesão celular. Os resultados dos testes de citotoxicidade comprovaram que o revestimento de polímeros com filmes de TiO₂ aumenta a biocompatibilidade do material. Para o PEEK a maior biocompatibilidade é alcançada para TiO₂ depositado com 1500W e 25% de oxigénio. A 1000W a maior biocompatibilidade é obtida para filmes de TiO₂ produzidos a 25% e 75% de oxigénio, pois os valores são praticamente idênticos; para as outras percentagens o valor da biocompatibilidade também não é muito diferente do máximo observado. Para o PEAD o maior valor da biocompatibilidade ocorre para filmes de TiO₂ depositados a 50% de oxigénio e 1000W. As amostras dos filmes de TiO₂ em PEAD depositados a 500W têm maior biocompatibilidade quando é utilizada 25% de oxigénio.

Depois de caracterizar os filmes de TiO₂ bem como avaliar a biocompatibilidade dos materiais produzidos pode-se concluir que uma espessura de filme maior resulta numa maior biocompatibilidade e para tal é necessária uma maior potência (1500W) e uma menor percentagem de oxigénio (25 a 50%) para o PEEK. Quando é aplicada uma potência de 1000W e 75% de oxigénio obtém-se um filme com uma espessura e uma biocompatibilidade muito próxima dos máximos obtidos, respetivamente. Para se obter um filme com maior espessura e um material mais biocompatível no PEAD é necessário utilizar uma potência mais elevada (1000W), porém a maior espessura ocorre aos 25% de oxigénio, já a maior biocompatibilidade ocorre aos 50%.

Os ângulos de contato medidos mostram que para obter-se uma maior biocompatibilidade é necessário um menor ângulo de contato quando comparado com o ângulo obtido sem tratamento, no entanto esse ângulo não deve ser menor do que 38,1° no PEEK. Para o PEAD o ângulo de contato deve ser superior ao ângulo medido sem tratamento para se obter uma maior biocompatibilidade, porém para obter uma maior biocompatibilidade o ângulo não deve ser superior a 67,3°. Tanto para o PEEK como para o PEAD a maior biocompatibilidade é atingida quando a superfície dos filmes de TiO₂ é mais densa e os aglomerados são maiores.

Com o teste de adesão das células, verificou-se que os materiais que apresentaram melhor biocompatibilidade, também apresentam melhor adesão às células, no entanto a amostra do filme no PEAD que possui a maior biocompatibilidade, têm uma taxa de adesão um pouco superior à amostra do filme no PEEK, que possui a maior biocompatibilidade quando comparada com todo o conjunto estudado. A marcação com a proteína DAPI, confirmou a presença das células de osteoblastos nas amostras onde foi efetuada a cultura, evidenciando assim, a sua adesão aos biomateriais produzidos.

Com este trabalho foi possível concluir que o revestimento de polímeros com filmes de TiO_2 aumenta a sua biocompatibilidade e a adesão das células, que são parâmetros de extrema importância no que se refere a biomateriais para aplicação médica. As características do PEEK e do PEAD, combinadas com o revestimento por filmes de TiO_2 dão evidências de que são biomateriais adequados para a aplicação em ortopedia.

5.2 Trabalho futuro

Após analisar a biocompatibilidade dos biomateriais desenvolvidos é importante avaliar a sua adesão às células, pois um dos problemas dos polímeros para aplicação médica é a sua baixa energia livre, principalmente para o PEEK, o que resulta numa fraca adesão. Apesar de neste trabalho ter-se realizado este teste é importante realizar mais culturas, de forma a ter uma maior estatística para poder-se realmente fundamentar o estudo efetuado.

Para que estes biomateriais venham a ser utilizados em ortopedia é necessário também avaliar a sua resistência, efetuando testes de tração, de modo a avaliar as suas características e as possíveis consequências do seu uso.

6 Referências bibliográficas:

- [1] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castan, and J. A. Planell, “Review. Biomaterials in orthopaedics,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 5, no. July, pp. 1137–1158, 2008.
- [2] Ministry of Labour Solidarity and Social Security (MTSSS) and Strategy and Planning Office (GEP), “Third Review and Appraisal of the Regional Implementation Strategy (RIS) of the Madrid International Plan of Action on Ageing (MIPAA),” 2017.
- [3] SP Intervention do Brasil, “Cimento Ortopédico Exolent,” 2016. [Online]. Available: http://www.spi.med.br/noticias_01.php. [Accessed: 19-Sep-2018].
- [4] A. Sáenz, E. Rivera-muñoz, W. Brostow, and V. M. Castaño, “Ceramic Biomaterials : an Introductory Overview,” *J. Mater. Educ.*, vol. 21, no. 5–6, pp. 297–306, 1999.
- [5] R. M. Pilliar, “Metallic Biomaterials,” in *Biomedical Materials*, R. Narayan, Ed. Alemanha: Springer Science and Business Media, 2009, pp. 1–566.
- [6] L. G. Griffith, “Polymeric biomaterials,” *Acta Mater.*, vol. 48, no. 1, pp. 263–277, 2000.
- [7] Medacta Corporate, “Substituição Total Do Quadril,” 2017. [Online]. Available: <https://www.medacta.com/PT/hip-replacement>. [Accessed: 19-Sep-2018].
- [8] L. B. Rodrigues, “Aplicações de biomateriais em ortopedia,” *Estud. Tecnológicos em Eng.*, vol. 9, no. 2, pp. 63–76, 2013.
- [9] S. C. S. Resende, “Aplicações dos Biomateriais em Ortopedia,” M.S. thesis, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.
- [10] T. Kizuki, T. Matsushita, and T. Kokubo, “Apatite-forming PEEK with TiO₂ surface layer coating,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 26, no. 41, p. 5359, Jan. 2015.
- [11] L. S. Nair and C. T. Laurencin, “Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery,” *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 102, pp. 47–90, 2006.
- [12] T. S. Srivatsan, “Materials Processing Handbook , Joanna R. Groza, James F. Shackelford, Enrique J. Lavernia, and Michael T. Powers, Editors,” *Mater. Manuf. Process.*, vol. 27, no. 10, pp. 1146–1147, Oct. 2012.
- [13] D. Merche, N. Vandencastele, and F. Reniers, “Atmospheric plasmas for thin film deposition: A critical review,” *Thin Solid Films*, vol. 520, no. 13, pp. 4219–4236, 2012.
- [14] L. Bárdos and H. Baránková, “Cold atmospheric plasma: Sources, processes, and applications,” *Thin Solid Films*, vol. 518, no. 23, pp. 6705–6713, 2010.
- [15] X. Chen, Y. Cheng, T. Li, and Y. Cheng, “Characteristics and applications of plasma assisted chemical processes and reactors,” *Curr. Opin. Chem. Eng.*, vol. 17, pp. 68–77, Aug. 2017.
- [16] T. Felix, “Funcionalização Físico-Química De Superfícies Poliméricas Por Plasma Frio,”

PhD thesis, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

- [17] M. Laroussi, “The biomedical applications of plasma: A brief history of the development of a new field of research,” *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 36, no. 4, pp. 1612–1614, 2008.
- [18] M. Laroussi, “Low-temperature plasmas for medicine?,” *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 37, no. 6 PART 1, pp. 714–725, 2009.
- [19] R. A. Siliprandi, “Atmospheric Pressure Plasmas for Surface Modifications,” PhD thesis, Universidade de Milano-Bicocca, Milão, 2007.
- [20] H. E. Wagner, R. Brandenburg, K. V. Kozlov, A. Sonnenfeld, P. Michel, and J. F. Behnke, “The barrier discharge: Basic properties and applications to surface treatment,” *Vacuum*, vol. 71, no. 3, pp. 417–436, 2003.
- [21] A. Van Deynse, P. Cools, C. Leys, N. De Geyter, and R. Morent, “Surface activation of polyethylene with an argon atmospheric pressure plasma jet: Influence of applied power and flow rate,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 328, pp. 269–278, 2015.
- [22] C. Wang, G. Zhang, X. Wang, and X. He, “The effect of air plasma on barrier dielectric surface in dielectric barrier discharge,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 257, no. 5, pp. 1698–1702, 2010.
- [23] R. Y. Honda, K. G. Kostov, R. P. Mota, M. E. Kayama, A. L. R. Santos, and C. E. S. Amorim, “Caracterização Elétrica De Um Reator De Descarga Por Barreira Dielétrica E Aplicação No Tratamento De Madeiras,” *Rev. Bras. Apl. Vácuo*, vol. 26, no. 4, pp. 181–185, 2007.
- [24] T. Von Woedtke, H. R. Metelmann, and K. D. Weltmann, “Clinical Plasma Medicine: State and Perspectives of in Vivo Application of Cold Atmospheric Plasma,” *Contrib. to Plasma Phys.*, vol. 54, no. 2, pp. 104–117, 2014.
- [25] D. W. van Krevelen and K. te Nijenhuis, *Properties of Polymers*, vol. 4. Amsterdam: Elsevier Science, 2009.
- [26] J. Yang and J. Kopeček, “Macromolecular therapeutics,” *J. Control. Release*, vol. 190, pp. 288–303, 2014.
- [27] A. J. Peacock and A. R. Calhoun, *Polymer Chemistry: Properties and Application*. Munich: Hanser Gardner Publishers, Inc, 2006.
- [28] D. Banoriya, R. Purohit, and R. K. Dwivedi, “Advanced Application of Polymer based Biomaterials,” *Mater. Today Proc.*, vol. 4, no. 2, pp. 3534–3541, 2017.
- [29] S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, and K. W. Leong, “Biomedical applications of polymer-composite materials: a review,” *Compos. Sci. Technol.*, vol. 61, pp. 1189–1224, 2001.
- [30] J. R. Roth, *Industrial Plasma Engineering*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2001.
- [31] A. Bogaerts, E. Neyts, R. Gijbels, and J. Van der Mullen, “Gas discharge plasmas and

- their applications,” *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.*, vol. 57, no. 4, pp. 609–658, 2002.
- [32] M. T. Tsai, Y. Y. Chang, H. L. Huang, J. T. Hsu, Y. C. Chen, and A. Y. J. Wu, “Characterization and antibacterial performance of bioactive Ti-Zn-O coatings deposited on titanium implants,” *Thin Solid Films*, vol. 528, pp. 143–150, 2013.
 - [33] P. Ruszniak, J. Józwik, D. Ostrowski, and K. Dziedzic, “Shearing Strength Test of Orthopedic Titanium Alloy Screw Produced in the Process of 3D Technology Printing,” *Adv. Sci. Technol. Res. J.*, vol. 11, no. 1, pp. 128–137, 2016.
 - [34] S. Nezar *et al.*, “Properties of TiO₂ thin films deposited by rf reactive magnetron sputtering on biased substrates,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 395, pp. 172–179, 2017.
 - [35] J. A. Jackman, G. H. Zan, Z. Zhao, and N. J. Cho, “Contribution of the hydration force to vesicle adhesion on titanium oxide,” *Langmuir*, vol. 30, no. 19, pp. 5368–5372, 2014.
 - [36] M. F. C. Ordonez, J. S. R. Paruma, F. sequeda Osorio, and M. C. M. Farias, “The effect of counterpart material on the sliding wear of TiAlN coatings deposited by reactive cathodic pulverization,” *Sci. Cum Ind.*, vol. 3, no. 2, pp. 59–66, 2015.
 - [37] A. E. Wiacek, K. Terpiłowski, M. Jurak, and M. Worzakowska, “Low-temperature air plasma modification of chitosan-coated PEEK biomaterials,” *Polym. Test.*, vol. 50, pp. 325–334, 2016.
 - [38] A. E. Wiacek, K. Terpiłowski, M. Jurak, and M. Worzakowska, “Effect of low-temperature plasma on chitosan-coated PEEK polymer characteristics,” *Eur. Polym. J.*, vol. 78, pp. 1–13, 2016.
 - [39] P. R. Monich *et al.*, “Physicochemical and biological assessment of PEEK composites embedding natural amorphous silica fibers for biomedical applications,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 79, pp. 354–362, 2017.
 - [40] J. Song *et al.*, “Fretting wear study of PEEK-based composites for bio-implant application,” *Tribol. Lett.*, vol. 65, no. 4, pp. 1–11, 2017.
 - [41] F. M. B. Coutinho, I. L. Mello, and L. C. de Santa Maria, “Polietileno: principais tipos, propriedades e aplicações,” *Polímeros Ciência e Tecnol.*, vol. 13, no. 1, pp. 01-13, 2003.
 - [42] M. N. Khalaf, “Mechanical properties of filled high density polyethylene,” *J. Saudi Chem. Soc.*, vol. 19, no. 1, pp. 88–91, 2015.
 - [43] U. Kogelschatz, “Dielectric-barrier Discharges : Their History, Discharge Physics, and Industrial Applications,” *Plasma Chem. Plasma Process.*, vol. 23, no. 1, pp. 1–46, 2003.
 - [44] M. Ciprian, G. Ioni, C. Popa, and S. R. L. Inventiv, “Modern methods and procedures for submission of thin layers in vacuum,” *Sci. Bull. VALAHIA Univ. – Mater. Mech.*, vol. 7, no. 10, pp. 19–22, 2012.
 - [45] T. Zhao and L. Jiang, “Contact angle measurement of natural materials,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 161, pp. 324–330, 2018.
 - [46] U. Kogelschatz, B. Eliasson, W. Egli, U. Kogelschatz, B. Eliasson, and W. E. D. D.

Principle, “Dielectric-Barrier Discharges . Principle and Applications To cite this version : HAL Id : jpa-00255561,” 1997.

- [47] T. Shao *et al.*, “Surface modification of polyimide films using unipolar nanosecond-pulse DBD in atmospheric air,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 256, no. 12, pp. 3888–3894, 2010.
- [48] A. Wolkenhauer, G. Avramidis, Y. Cai, H. Miltz, and W. Viöl, “Investigation of wood and timber surface modification by dielectric barrier discharge at atmospheric pressure,” *Plasma Process. Polym.*, vol. 4, pp. 470–474, 2007.
- [49] A. L. Ryland, “X-Ray Diffraction,” *J. Chem. Educ.*, vol. 35, no. 2, pp. 80–83, 1958.
- [50] L. C. de C. Silva, “Desenvolvimento e caracterização de filmes de nano-compósitos de TiO₂/WO₃ pela técnica de pulverização catódica,” M.S. thesis, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Caparica, 2012.
- [51] F. G. Wolf, L. O. E. dos Santos, and P. C. Philippi, “Formação e dinâmica da interface líquido-vapor simulada pelo método Lattice-Boltzmann,” *Rev. Bras. Ensino Fis.*, vol. 28, no. 2, pp. 167–175, 2006.
- [52] B. Dutrow and C. Clark, “X-ray Powder Diffraction (XRD),” *National Science Foundation*, 2017. [Online]. Available: https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/XRD.html. [Accessed: 29-Jan-2018].
- [53] E. A. Sanches, “Estudos de XRD e SAXS aplicados à Polianilina e à Poli (o - metoxianilina),” PhD thesis, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- [54] B. A. Dedavid, C. I. Gomes, and G. Machado, *MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA - Aplicações e preparação de amostras - Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.
- [55] W. Zhou, R. P. Apkarian, and Z. L. Wang, “Fundamentals of Scanning Electron Microscopy,” *Scanning Microsc. Nanotechnol.*, pp. 1–40, 2007.
- [56] Microscopemaster, “Scanning Electron Microscope - Advantages and Disadvantages in Imaging,” 2015. [Online]. Available: <http://www.microscopemaster.com/scanning-electron-microscope.html>. [Accessed: 29-Jan-2018].
- [57] D. A. Hudman and N. J. Sargentini, “Resazurin-based assay for screening bacteria for radiation sensitivity,” *Springerplus*, vol. 2, no. 1, pp. 1–6, 2013.
- [58] T. L. Riss, A. L. Niles, and L. Minor, “Cell Viability Assays Assay Guidance Manual,” *Assay Guidance Manual*, 2004. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>. [Accessed: 25-May-2018].
- [59] S. Sério, M. E. Melo Jorge, M. J. P. Maneira, and Y. Nunes, “Influence of O₂ partial pressure on the growth of nanostructured anatase phase TiO₂ thin films prepared by DC reactive magnetron sputtering,” *Mater. Chem. Phys.*, vol. 126, no. 1–2, pp. 73–81, 2011.

7 Anexos

Anexo 1

DMEM - For Vero, 3T3, C2C12, HFFF2

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich #D5030) supplemented with 1.0 g/L D-glucose (Gibco, #15023-021), 3.7 g/L sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich, #S5761), 1% GlutaMAX™ (L-alanyl-L-glutamine dipeptide, Life Technologies, #35050-038), 1% sodium pyruvate (Gibco, #11360039), penicillin (100U/ml) and streptomycin (100 µg/mL) (Invitrogen, #15140122), 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Invitrogen, #10270106).

McCoy's 5A - For SAOS-2

McCoy's 5A (Sigma-Aldrich #M4892) supplemented with 2.2 g/L sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich, #S5761), penicillin (100U/ml) and streptomycin (100 µg/mL) (Invitrogen, #15140122) and 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Invitrogen, #10270106).

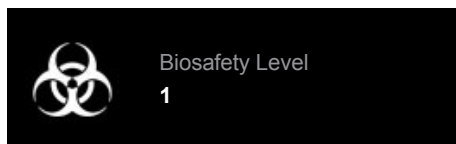
Anexo 2



Product Sheet

Saos-2 (ATCC® HTB-85™)

Please read this FIRST



Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated McCoy's 5a Medium Modified, Catalog No. 30-2007. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 15%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: Saos-2 (ATCC® HTB-85™)



Description

Organism: *Homo sapiens*, human

Tissue: bone

Disease: osteosarcoma

Age: 11 years

Gender: female

Morphology: epithelial

Growth Properties: adherent

Isoenzymes:

AK-1, 1

ES-D, 2

G6PD, B

GLO-I, 2

Me-2, 1

PGM1, 1-2

PGM3, 1-2

DNA Profile:

Amelogenin: X

CSF1PO: 10

D13S317: 12,13

D16S539: 12,13

D5S818: 12

D7S820: 8,10

TH01: 6,9

TPOX: 8

vWA: 18

Cytogenetic Analysis: The stemline chromosome number is hypotriploid with the modal number of 56 chromosomes per cell and the 2S component occurring at 13.2%. Over two-thirds of the chromosome complement consisted of structurally rearranged chromosomes. Most marker chromosomes had complex rearrangements. The origin of the segments composing these markers could not be identified. Of the identifiable markers, 6p+/q+, 7p+, 11p+, and 12p+ occasionally were present at 2 copies per cell. The Y chromosome was not detected in the QM stained preparation.



Batch-Specific Information

Refer to the Certificate of Analysis for batch-specific test results.



SAFETY PRECAUTION

ATCC highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full face mask always be worn when handling frozen vials. It is important to note that some vials leak when submersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.



Unpacking & Storage Instructions

1. Check all containers for leakage or breakage.
2. Remove the frozen cells from the dry ice packaging and immediately place the cells at a temperature below -130°C, preferably in liquid nitrogen vapor, until ready for use.



Handling Procedure for Frozen Cells

To insure the highest level of viability, thaw the vial and initiate the culture as soon as possible upon receipt. If upon arrival, continued storage of the frozen culture is necessary, it should be stored in liquid nitrogen vapor phase and not at -70°C. Storage at -70°C will result in loss of viability.

1. Thaw the vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
2. Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. All of the operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.
3. Transfer the vial contents to a centrifuge tube containing 9.0 mL complete culture medium. and spin at approximately 125 x g for 5 to 7 minutes.
4. Resuspend cell pellet with the recommended complete medium (see the specific batch information for

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

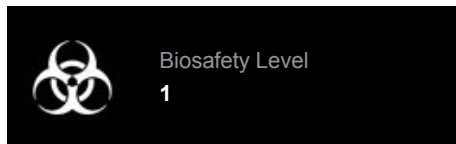
Or contact your local distributor



Product Sheet

Saos-2 (ATCC® HTB-85™)

Please read this FIRST



Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated McCoy's 5a Medium Modified, Catalog No. 30-2007. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 15%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: Saos-2 (ATCC® HTB-85™)

the culture recommended dilution ratio). It is important to avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells. It is suggested that, prior to the addition of the vial contents, the culture vessel containing the complete growth medium be placed into the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH (7.0 to 7.6).

- Incubate the culture at 37°C in a suitable incubator. A 5% CO₂ in air atmosphere is recommended if using the medium described on this product sheet.



Handling Procedure for Flask Cultures

The flask was seeded with cells (see specific batch information) grown and completely filled with medium at ATCC to prevent loss of cells during shipping.

- Upon receipt visually examine the culture for macroscopic evidence of any microbial contamination. Using an inverted microscope (preferably equipped with phase-contrast optics), carefully check for any evidence of microbial contamination. Also check to determine if the majority of cells are still attached to the bottom of the flask; during shipping the cultures are sometimes handled roughly and many of the cells often detach and become suspended in the culture medium (but are still viable).
- If the cells are still attached**, aseptically remove all but 5 to 10 mL of the shipping medium. The shipping medium can be saved for reuse. Incubate the cells at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until they are ready to be subcultured.
- If the cells are not attached**, aseptically remove the entire contents of the flask and centrifuge at 125 x g for 5 to 10 minutes. Remove shipping medium and save. Resuspend the pelleted cells in 10 mL of this medium and add to 25 cm² flask. Incubate at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until cells are ready to be subcultured.



Subculturing Procedure

Remove medium, and rinse with 0.25% trypsin, 0.03% EDTA solution. Remove the solution and add an additional 1 to 2 mL of trypsin-EDTA solution. Allow the flask to sit at room temperature (or at 37°C) until the cells detach. Add fresh culture medium, aspirate and dispense into new culture flasks. Corning® T-75 flasks (catalog #430641) are recommended for subculturing this product.

Subcultivation Ratio: A subcultivation ratio of 1:2 to 1:4 is recommended

Medium Renewal: 1 to 2 times per week



Cryopreservation Medium

Complete culture medium described above supplemented with 5% (v/v) DMSO. Cell culture tested DMSO is available as ATCC Catalog No. 4-X.



Comments

The patient was treated with RTG, methotrexate, adriamycin, vincristine, cytoxan, and aramycin-C.



References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

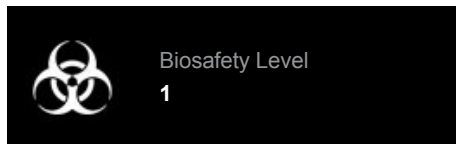
Or contact your local distributor



Product Sheet

Saos-2 (ATCC® HTB-85™)

Please read this FIRST



Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated McCoy's 5a Medium Modified, Catalog No. 30-2007. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 15%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: Saos-2 (ATCC® HTB-85™)

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.

© ATCC 2018. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [08/17]

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor